



Étude du rôle vecteur de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dans la transmission des babésioses canines en France : prévalence parasitaire, diversité génétique des vecteurs et épidémiologie

Magalie René-Martellet

► To cite this version:

Magalie René-Martellet. Étude du rôle vecteur de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dans la transmission des babésioses canines en France : prévalence parasitaire, diversité génétique des vecteurs et épidémiologie. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10044 . tel-01169648

HAL Id: tel-01169648

<https://theses.hal.science/tel-01169648>

Submitted on 29 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 44 - 2013

Année 2013

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE : Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

LABORATOIRES : Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés Vetagro Sup
UMR 5557 Écologie Microbienne de Lyon

DIPLÔME DE DOCTORAT EN BIOLOGIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 15 mars 2013 par

Madame **Magalie RENÉ-MARTELLET** née **RENÉ**

Étude du rôle vecteur de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dans la transmission des babésioses canines en France : prévalence parasitaire, diversité génétique des vecteurs et épidémiologie

Directeur de thèse : Monsieur Luc CHABANNE

Co-Directeur : Monsieur Patrick MAVINGUI

JURY

Madame **Karine HUBER** (Chargé de Recherche, INRA, Montpellier)

Examineur

Monsieur **Pierre JOLY** (Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon)

Examineur

Monsieur **Kurt PFISTER** (Professeur, Faculté de Médecine Vétérinaire, Munich)

Rapporteur

Madame **Muriel VAYSSIER-TAUSSAT** (Directeur de Recherche, INRA, Maisons-Alfort)

Rapporteur

Monsieur **Luc CHABANNE** (Professeur, VetAgro Sup campus Vétérinaire, Lyon)

Directeur de thèse

Monsieur **Patrick MAVINGUI** (Directeur de Recherche, CNRS, Lyon)

Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. R. BERNARD

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

A Luc Chabanne et Patrick Mavingui pour avoir accepté d'encadrer ce travail avec patience et détermination.

A Claire Valiente Moro et Gilles Bourdoiseau pour leurs encadrements scientifique et technique, leurs conseils avisés et leurs relectures attentives à chaque étape de ce travail.

A Jeanne Chêne et Van Tran pour m'avoir formée aux rudiments de la biologie moléculaire et pour m'avoir fait partager leur expérience du laboratoire.

Je remercie le Professeur Kurt Pfister et le Docteur Muriel Vayssier-Taussat pour avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Professeur Pierre Joly et le Docteur Karine Huber pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci aussi aux Docteurs Frédéric Beugnet et Karine Chalvey-Monfray et au Professeur Henri-Jean Boulouis pour leur aide et les conseils prodigués en qualité de membres du comité de pilotage.

Un grand merci aux vétérinaires - les Docteurs Didier Abrard, Jean-Pierre Beaufiles et associés, Jean-Paul Berruyer, Bernard Fabrizio, Nicolas Grevet, Christophe Hugnet, David Nicklaus et associés, Christian Rives et Nathalie Foyen, Thierry et Marie Segalen, Sarah Warnery - et aux éleveurs, sociétés de chasse sociétés et de protection des animaux - Madame Rallye, Madame Castelain, le dispensaire SPA de Toulon, le refuge de Bastia, Monsieur Rosier et la société de chasse de Montrigaud - sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir. Pour la confiance qu'ils m'ont accordée, l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude et leur énergie.

Un grand merci également à toute l'équipe du SIAMU (Service d'urgence de Vetagro Sup campus vétérinaire de Lyon) pour leur participation à ce travail et pour l'accueil toujours sympathique qui m'a été réservé. Merci également à toutes les personnes (personnels, étudiants, enseignants) de Vetagro Sup qui ont, d'une manière ou d'une autre, collaboré au projet.

A tous les membres du Service de parasitologie de Vetagro Sup campus vétérinaire de Lyon que je n'ai pas encore cités, Marie-Pierre, Lionel, Gilles, Marie-thérèse et Raphaël, pour leur soutien et leur amitié au cours de ces trois années.

A Christian, pour son amour, ses encouragements, sa patience à toute épreuve et son aide logistique efficace (et primordiale) au cours de ces trois années.

A Damienne et Lydie, mes sœurs, pour tous les bons moments et les épreuves traversées ensemble.

A Théo et Tom, ma joie de vivre, mon avenir.

A Jérémy, à qui je souhaite un avenir brillant et heureux.

A Marine, pour son amitié et son soutien permanent.

Au reste de ma famille et de mes amis.

Et bien évidemment à la mémoire de mes parents, pour l'amour et le soutien qu'ils m'ont apportés au cours de ces belles années passées ensemble.

Sommaire

Page de titre	1
Université Claude Bernard Lyon 1	3
Liste des abréviations	10
Liste des illustrations.....	12
 INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	 14
 MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE.....	 19
 Chapitre 1 : Les babésioses (piroplasmoses) canines	 20
1. Définition et historique.....	21
2. Les agents de piroplasmoses	22
2.1. Taxinomie et répartition géographique.....	22
2.2. Phylogénie	24
2.3. Morphologie	26
2.4. Cycles biologiques.....	27
2.4.1. <i>Babesia</i> sp.....	27
2.4.1.1. Développement chez l'hôte vertébré	28
2.4.1.2. Développement chez la tique.....	28
2.4.2. <i>Theileria</i> sp	30
2.4.3. Transmission et facteurs de modulation	30
3. Répercussions cliniques et pouvoir pathogène	31
4. Diagnostic expérimental.....	33
5. Traitement et prévention.....	34
5.1. Traitement	34
5.2. Prévention.....	35
6. Les babésioses canines en Europe et en France	36
6.1. En Europe	36
6.2. En France.....	37

Chapitre 2 : Les tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>.....	40
1. Définition et systématique.....	41
2. Phylogénie.....	42
3. Morphologie et anatomie générale.....	44
4. Cycle biologique.....	48
4.1. Etapes du cycle.....	48
4.2. Hôtes.....	50
5. Ecologie et distribution.....	51
6. Méthodes d'échantillonnage.....	54
7. Lutte.....	55
7.1. Lutte chimique.....	55
7.2. Lutte biologique.....	56
7.3. Prophylaxie vaccinale.....	57
 Chapitre 3 : Rôle vecteur des tiques <i>Rhipicephalus sanguineus sensu stricto</i>	58
1. Notion de vecteur et concepts associés	59
2. Transmission des agents pathogènes de la tique à l'hôte et inversement	61
2.1. Transmission des agents pathogènes au cours du repas de sang	61
2.1.1. Déroulement d'un repas de sang	61
2.1.2. Modalités de transmission au cours du repas de sang	63
2.1.3. Particularités du repas de sang favorisant la transmission.....	63
2.2. Transmission verticale et transmission trans-stadiale.....	64
2.3. Autres modes de transmission.....	64
2.4. Autres facteurs favorisant la transmission.....	65
3. Agents pathogènes transmis par les tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	65
3.1. <i>Babesia vogeli</i>	65
3.2. <i>Ehrlichia canis</i>	66
3.3. Rickettsies agents de fièvres boutonneuses	66
3.4. <i>Hepatozoon canis</i>	68
3.5. Autres espèces potentiellement transmises.....	69
 PROBLEMATIQUE ET MODELE D'ETUDE	71

MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL	75
----------------------------	----

Chapitre 1 : Enquête épidémiologique multirégionale sur la babésiose canine en France et choix de sites pour l'étude de la dynamique de transmission..... 76

1. Analyse des résultats d'une enquête épidémiologique multirégionale sur la babésiose canine conduite en 2006-2007 en France.....	78
1.1. Introduction	78
1.2. Publication n°1 : "Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: results of a multiregional study"	78
1.3. Conclusion.....	100
2. Enquête préliminaire pour l'identification des sites d'étude	101
2.1. Introduction	101
2.2. Méthodologie.....	101
2.2.1. Sélection et définition des sites d'étude	101
2.2.2. Récolte des échantillons	103
2.2.2.1. Echantillonnage individuel.....	103
2.2.2.2. Echantillonnage collectif.....	103
2.2.3. Identification des tiques.....	104
2.2.4. Calcul du taux d'infestation.....	104
2.3. Résultats	104
2.3.1. Récolte des tiques toutes méthodes confondues.....	104
2.3.2. Récolte des tiques par la méthode d'échantillonnage individuel.....	107
2.4. Discussion	108
2.5. Conclusion.....	111

Chapitre 2 : Etude du portage en protozoaires de l'espèce *Babesia vogeli* chez les chiens et les tiques *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dans la région de Sommières (Gard, France) 112

1. Introduction	113
2. Publication n°2 : "First evidence and molecular characterization of <i>Babesia vogeli</i> in naturally infected dogs and <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ticks in southern France"	114
3. Conclusion.....	124

Chapitre 3 : Babésioses canines dans le Sud de la France : épidémiologie et étude conjointe de la génétique des tiques <i>R. sanguineus</i> s.l. et du protozoaire <i>B. vogeli</i>	125
1. Introduction	126
2. Publication n°3 : “Piroplasms of dogs and <i>R. sanguineus</i> ticks in southern France: epidemiological aspects and evolutionary perspectives”	127
3. Conclusion	164
 Chapitre 4 : Etude du portage de bactéries <i>Anaplasmataceae</i> des tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. et des chiens dans le Sud de la France	166
1. Introduction	167
2. Méthodologie	169
2.1. Sérologie	169
2.2. Amplification par PCR de l’ADN des <i>Anaplasmataceae</i>	170
2.2.1. PCR généraliste pour la détection des <i>Anaplasmataceae</i>	170
2.2.2. Détection spécifique d’ <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i> et <i>E. canis</i>	171
2.3. Analyses statistiques	173
3. Résultats	173
3.1. Analyse des sangs et des tiques <i>R. sanguineus</i> de Drôme, du Gard et de Corse	173
3.1.1. Résultats des tests Snap® 4Dx® sur sérums de chiens	173
3.1.2. Résultats des analyses PCR des sangs de chiens et des tiques	174
3.2. Recherche de co-infections	175
3.2.1. Résultats des tests Snap® 4Dx® sur sérums de chiens positifs à <i>B. vogeli</i>	175
3.2.2. Analyses PCR des échantillons (sangs et tiques) positifs à <i>B. vogeli</i>	175
4. Discussion	176
5. Conclusion	178
 DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	180
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

ANNEXES	200
Annexe 1: Distribution des tiques dans le Paléarctique occidental	200
Annexe 2: Fiche de commémoratifs - échantillonnage individuel	201
Annexe 3: Principe de la technologie ELISA employée dans le Test Snap® 4Dx®	203
 RESUME / ABSTRACT	 206

Liste des abréviations

° C	Degré Celcius
° N	Degré Nord
° S	Degré Sud
%	Pour cent
µm	Micromètre
µM	Micromole par litre
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
ADNr-mt	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal mitochondrial
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
B.	<i>Babesia</i>
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
CNRS	Centre Nationale de la Recherche Scientifique
COI	Cytochrome Oxidase c sous-unité 1
CR	Chargé de recherche
DR	Directeur de recherche
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESCCAP	European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
et al.	<i>Et alii</i> (et collaborateurs)
Fig.	Figure
h	Heure
IFI	Immunofluorescence indirecte
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
ITS	Internal Transcribed Spacers
Min.	Minutes
mg/kg	Milligrammes par kilo
mm	Millimètre
N	Nombre
NCBI	National Center for Biotechnology Information

ng	Nanogramme
OMS / WHO	Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization
OR	Odds ratio
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Picomole
R.	<i>Rhipicephalus</i>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RLB	Reverse Line Blot
s	Seconde
s.l.	<i>Sensu lato</i>
sp.	Espèce
s.s.	<i>Sensu stricto</i>
T.	<i>Theileria</i>
U	Unité
UMR	Unité Mixte de Recherche
USA	United States of America (Etats-Unis)
USC	Unité Sous Contrat
V	Volt

Liste des illustrations

FIGURES

Mémoire bibliographique

Figure 1 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences partielles (1621 paires de bases) du gène de l'ARNr 18S de 45 espèces des genres <i>Babesia</i> et <i>Theileria</i> de mammifères et hypothèses évolutives	25
Figure 2 : Image au microscope électronique à transmission de deux mérozoïtes de <i>Babesia conradae</i> en division dans un globule rouge de chien.....	26
Figure 3 : Morphologie « typique » de « grands » et « petits » piroplasmes dans des hématies de chien au microscope optique après coloration May-Grünwald-Giemsa d'un étalement de sang.....	27
Figure 4 : Cycle de développement de <i>Babesia canis</i> chez ses hôtes, vertébré et arthropode.	29
Figure 5 : Distribution des espèces de piroplasmes du chien en Europe sur la base de criblages moléculaires.....	37
Figure 6 : Répartition des cas de piroplasmose canine en France	38
Figure 7 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences de l'ADNr 12S de <i>R. sanguineus</i> et <i>R. turanicus</i> de diverses origines géographiques.....	43
Figure 8 : Morphologie externe des tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	45
Figure 9 : Représentation schématique des organes internes d'une tique femelle en vue ventrale	47
Figure 10 : Cycle de vie des tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	49
Figure 11 : Répartition géographique des trois principales espèces de tiques de France.....	53
Figure 12 : Récolte des tiques <i>R. sanguineus</i>	55
Figure 13 : Représentation schématique d'un système vectoriel.....	61
Figure 14 : Repas de sang d'une tique dure femelle sur la peau de son hôte	62
Figure 15 : <i>Hepatozoon canis</i> au microscope optique après coloration May-Grünwald-Giemsa d'un étalement de sang de chien infecté	69

Mémoire expérimental

Figure 16 : Présentation du pathosystème vectoriel de l'étude.	73
Figure 17 : Localisation géographique des sites d'étude (enquête préliminaire)..	102
Figure 18 : Nombre et identification des tiques récoltées par département.....	105
Figure 19 : Pourcentage de tiques récoltées par département.....	106
Figure 20 : Départements sélectionnées pour la recherche des agents pathogènes chez les hôtes et les vecteurs.....	111

Figure 21 : Représentation d'un test Snap® 4Dx® positif pour tous les agents bactériens ou parasitaires recherchés.....	170
Figure 22 : Détection par PCR multiplexe des agents pathogènes <i>E. canis</i> , <i>A. platys</i> et <i>A. phagocytophilum</i> dans le sang de chiens infectés.	172
Figure 23 : Distribution des espèces de tiques dans l'espace géographique du Paléarctique occidental	200

TABLEAUX

Mémoire bibliographique

Tableau 1 : Piroplasmes du chien dont l'infection a été confirmée par observation microscopique des parasites.....	22
Tableau 2 : Piroplasmes du chien dont l'infection a été détectée uniquement par des méthodes moléculaires.....	23
Tableau 3 : Classification et principales caractéristiques des tiques du genre <i>Rhipicephalus</i>	41
Tableau 4 : Autres agents pathogènes transmis ou potentiellement transmis par <i>R. sanguineus</i>	70

Mémoire expérimental

Tableau 5 : Principales caractéristiques des sites et modalités de récolte des échantillons.	102
Tableau 6 : Récolte et identification des tiques, toutes méthodes confondues.....	105
Tableau 7 : Récolte et identification des tiques par échantillonnage individuel.	107
Tableau 8 : Taux d'infestation de chiens par département.....	108
Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection généraliste et spécifique des <i>Anaplasmataceae</i>	172
Tableau 10 : Snap® 4Dx® sur sérums de chiens de Drôme, Gard et Corse.....	173
Tableau 11 : Résultats de l'analyse PCR <i>Anaplasmataceae</i> sur les sangs de chiens et les tiques <i>R. sanguineus</i> de Drôme, Gard et Corse.....	174

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Les maladies infectieuses sont dues à des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, parasites et champignons) qui peuvent être transmis de façon directe ou indirecte d'un être vivant à l'autre (WHO, 2012). Elles constituent la deuxième cause de mortalité humaine et sont responsables de 40% des pertes de productions agricoles (WHO, 2007). En 2008, elles ont entraîné la mort de plus de 8,7 millions de personnes dans le monde (WHO, 2012).

Parmi ces maladies infectieuses, les maladies vectorielles occupent une part importante. Le paludisme notamment est responsable à lui seul de 1 à 3 millions de décès humain par an (Harrus et Baneth, 2005). Les maladies vectorielles font intervenir un pathosystème complexe dans lequel interagissent des vecteurs, des hôtes et des agents pathogènes dans un écosystème lui-même influencé par l'environnement. Aussi, l'étude et la lutte contre ces maladies nécessitent-elles la mise en place de méthodes intégratives capables de tenir compte de chacun des intervenants de ce système et des interactions existantes entre ces différents intervenants. Un vecteur est habituellement défini en entomologie médicale comme un « arthropode hématophage qui assure la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré » (Rodhain et Pérez-Eid, 1985). C'est donc un organisme qui ne provoque pas par lui-même la maladie mais qui est nécessaire à la dispersion de l'infection en transportant, mais également multipliant voire transformant un agent infectieux ou parasitaire (Chabanne et al., 2011).

Les tiques sont des arthropodes hématophages obligatoires, qui parasitent toutes les classes de vertébrés, dans presque toutes les régions du monde. Elles constituent un groupe composé d'au moins 989 espèces parmi lesquelles, les tiques « dures » (famille des *Ixodidae*) sont les plus importantes en nombre (703 espèces) et sur le plan médical (Dantas-Torres et al., 2012a; Parola et Raoult, 2001). Les tiques sont, avec les moustiques, les principaux vecteurs de maladies à l'homme et aux animaux sur la planète. En Europe, ce sont les premiers vecteurs de maladies toutes espèces confondues (Randolph, 2010). Une augmentation de la prévalence des maladies transmises par les tiques et une extension de leur aire de distribution (vers le Nord notamment) a été constatée en Europe au cours des dernières décennies (Beugnet et Marié, 2009; Dantas-Torres et al., 2012a; Randolph, 2010). Chaque année, plus de 50 000 cas de maladie de Lyme sont diagnostiqués chez l'homme en Europe (Dantas-Torres et al., 2012a). Le nombre de cas d'encéphalites à tiques est en constante augmentation

(Randolph, 2010). Des phénomènes similaires sont constatés chez les espèces animales chez lesquelles des maladies telles que babésioses, anaplasmoses, ehrlichioses et leishmanioses sont en progression régulière (Beugnet et Marié, 2009). Certaines de ces maladies sont potentiellement zoonotiques et requièrent une attention toute particulière.

Dans le système vectoriel tique-vertébré-pathogène, les tiques et la faune sauvage constituent les principaux réservoirs de pathogènes d'intérêt médical et vétérinaire (Dantas-Torres et al., 2012a). Le rôle des animaux de compagnie dans le maintien, la dissémination et la transmission de ces pathogènes est mal connu, mais doit être envisagé (Day, 2011). En effet, leur nombre a fortement augmenté au cours des dernières décennies. Dans les pays industrialisés, ils passent désormais une grande partie de leur temps à l'intérieur des habitations et font partie intégrante de la famille avec laquelle les contacts sont fréquents. Si, dans le cas des tiques « dures » la transmission directe de maladies de l'animal à l'homme est peu probable, le risque d'introduction et de multiplication de vecteurs infectés dans les habitations est à considérer (Day, 2011). Ce risque existe notamment dans le cas de tiques endophiles comme l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*.

Rhipicephalus sanguineus, encore appelée « tique brune du chien » ou « tique de chenil », est probablement l'espèce de tique la plus largement distribuée sur la planète (Dantas-Torres, 2008; Gilot et Pérez-Eid, 1998). On la trouve principalement entre les latitudes 50°N et 35°S (Dantas-Torres, 2008 ; Gilot et Pérez-Eid, 1998). C'est une tique endophile, particulièrement adaptée au chien sur lequel ses trois stades se gorgent préférentiellement (Dantas-Torres, 2008; Gilot et Pérez-Eid, 1998). Par ailleurs, si un ou plusieurs hôtes sont disponibles, elle est capable de proliférer de manière considérable, notamment à l'intérieur ou à proximité des habitations. Elle peut également, de façon plus occasionnelle parasiter d'autres hôtes sauvages ou domestiques dont l'homme (Dantas-Torres, 2008; Gilot et Pérez-Eid, 1998).

Le statut taxonomique de *R. sanguineus* est controversé. *R. sanguineus sensu stricto* appartiendrait à un complexe d'espèces morphologiquement et génétiquement très proches, et rassemblées sous l'appellation *Rhipicephalus* groupe « *sanguineus* » ou *R. sanguineus sensu lato* (Dantas-Torres, 2008). De récentes études, associant des essais de croisements reproducteurs, des analyses génétiques et/ou des observations morphologiques, ont mis en évidence l'existence de deux populations différentes de *R. sanguineus* sur la planète. La première est distribuée essentiellement en zones tempérées et méditerranéennes alors que la seconde est plus souvent rencontrée en climats tropicaux (Burlini et al., 2010; de Oliveira et

al., 2005; Szabó et al., 2005). *Rhipicephalus sanguineus* est un vecteur connu ou suspecté d'un certain nombre de pathogènes d'importance médicale et vétérinaire. Elle est notamment responsable de la transmission de babésioses et d'ehrlichioses au chien et de rickettsioses à l'homme (Dantas-Torres, 2008).

Les babésioses canines (ou piroplasmoses) sont des maladies infectieuses dues à la multiplication intra-érythrocytaire de protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria* également appelés « piroplasmes » (Irwin, 2009). Elles sont transmises par l'intermédiaire de tiques dures et se caractérisent le plus souvent sur le plan clinique par un syndrome hémolytique et pyrétique parfois mortel (Irwin, 2009). En Europe, grâce à l'essor de la biologie moléculaire, quatre espèces de piroplasmes (*Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* et *Theileria annae*) capables d'infecter le chien ont été caractérisées à ce jour (Solano-Gallego et Baneth, 2011). *B. canis* est l'agent étiologique principal des babésioses canines en Europe (Matijatko et al., 2012). Des infections à *B. vogeli* ont été rapportées à plusieurs reprises dans des pays du pourtour méditerranéen tels que l'Italie, l'Espagne, le Portugal, l'Albanie, la Slovénie, la Croatie, la Turquie, la Tunisie et l'Égypte (Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; Criado-Fornelio et al., 2007; Duh et al., 2004; Gülanber et al., 2006; Hamel et al., 2009; M'ghirbi et Bouattour, 2008; Solano-Gallego et al., 2008; Uilenberg et al., 1989). Les cas d'infections par *B. gibsoni* et *Theileria annae* semblent plus anecdotiques (Solano-Gallego et Baneth, 2011).

Au début de ces travaux, seules deux espèces de babésies du chien, *B. canis* et *B. vogeli*, avaient été détectées et caractérisées sur le plan moléculaire en France. *B. canis* est transmise par des tiques de l'espèce *Dermacentor reticulatus* et est probablement l'espèce la plus répandue sur le territoire. *B. vogeli*, transmise par *Rhipicephalus sanguineus*, n'avait été détectée et caractérisée qu'une seule fois en France en 2002 chez un chien d'origine italienne qui aurait acquis le pathogène dans la région de Nantes (Cacciò et al., 2002). Pourtant, *R. sanguineus* est une espèce présente dans tout le bassin méditerranéen français (Gilot et Pérez-Eid, 1998). Des cas de babésioses canines sont régulièrement rapportés dans l'Ouest du bassin méditerranéen sans que les agents étiologiques n'aient jamais été caractérisés (Bourdoiseau et Renard, 2005; Lasbleiz, 2007). Les régions de l'Est du bassin méditerranéen et la Corse semblent, quant-à-elles, peu touchées par la maladie (Lasbleiz, 2007). Une seule étude fait état de la détection d'ADN de *B. vogeli* dans des tiques de l'espèce *R. sanguineus* récoltées dans le Sud de la France (Beugnet et Marié, 2009). Ainsi, d'une manière générale, en France et plus particulièrement dans le bassin méditerranéen, les connaissances sur l'épidémiologie de la babésiose canine et les vecteurs impliqués dans sa propagation sont limitées. Les

recherches s'intéressant à la caractérisation moléculaire des agents pathogènes et/ou le rôle potentiel de *R. sanguineus* dans la transmission de la maladie sont quasi inexistantes. Par ailleurs, malgré la disponibilité d'un traitement médical et de deux vaccins contre les piroplasmes du chien, les vétérinaires rapportent régulièrement des échecs thérapeutiques et vaccinaux.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont fixé plusieurs objectifs. **Le premier objectif** a été d'apporter de nouveaux éléments épidémiologiques sur la babésiose canine en France et plus particulièrement dans le Sud du pays. Ce premier objectif a été rendu possible grâce à la mise en place, dès le début de ce travail, (i) d'un réseau de surveillance de la maladie dans lequel ont été intégrés des vétérinaires et des responsables de chenils et (ii) d'un suivi des agents pathogènes circulant dans des populations de chiens sélectionnées. Pour répondre à cet objectif, deux méthodes, utilisant pour la première une PCR nichée et pour la deuxième une RFLP, ont été adaptées et utilisées conjointement afin de cibler les espèces de piroplasmes susceptibles d'être détectées chez des chiens en Europe. **Le second objectif de ce travail** a été d'évaluer le rôle vecteur potentiel des tiques *R. sanguineus* vis-à-vis des agents de babésioses (piroplasmoses) canines dans le Sud de la France. Ce second objectif a été mené à bien grâce à (i) la mise en place d'un réseau de surveillance des vecteurs dans plusieurs départements, (ii) la récolte de tiques sur des chiens et dans l'environnement et (iii) la détection par PCR des protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria* chez les vecteurs et leur caractérisation moléculaire. Une méthode PCR pour la détection spécifique de l'agent pathogène *B. vogeli* a été développée et utilisée en complément de la PCR-RFLP nichée pour la détection des agents pathogènes chez les chiens et les tiques. **Le troisième objectif** a été d'améliorer les connaissances sur la génétique des tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* » afin de tester l'hypothèse de l'existence de sous-espèces ou de populations différentes dans le Sud de la France. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de caractériser, par PCR et séquençage de gènes mitochondriaux, un nombre représentatif de tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* » récoltées dans le bassin méditerranéen français. Enfin, **le dernier objectif de ce travail** a été d'évaluer chez les chiens et les tiques *R. sanguineus* (i) la prévalence de l'infection par des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* (notamment *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys*) et (ii) l'importance des co-infections, par les protozoaires des genres *Babesia/Theileria* et ces bactéries dans la région étudiée. Pour répondre à cet objectif, des analyses préliminaires utilisant une PCR généraliste

pour la mise en évidence des bactéries *Anaplasmataceae* et une PCR multiplexe permettant la caractérisation spécifique des agents pathogènes *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Ehrlichia canis* ont été réalisées.

Aussi, ce manuscrit est-il composé de deux parties essentielles.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique visant à replacer ce travail dans son contexte scientifique général. Cette partie est structurée autour de trois chapitres consacrés à (i) la babésiose canine, les agents pathogènes responsables et l'état des connaissances sur cette maladie en Europe et en France, (ii) les tiques *Rhipicephalus sanguineus*, leur morphologie, leur cycle de vie et leur phylogénie et (iii) le rôle vecteur des tiques *R. sanguineus*.

La seconde partie expose en 4 chapitres les résultats et les avancées obtenus quant à (i) la connaissance de l'épidémiologie de la babésiose (piroplasmose) canine et le rôle vecteur potentiel des tiques *R. sanguineus* dans la transmission de cette maladie dans le Sud de la France, (ii) les éléments sur la génétique des tiques du complexe *R. sanguineus*, (iii) les connaissances sur la génétique du protozoaire *B. vogeli* et l'analyse phylogéographique conjointe de séquences de ce pathogène et de son vecteur, et (iv) le rôle vecteur potentiel de *R. sanguineus* pour les agents pathogènes bactériens de la famille des *Anaplasmataceae*. Quatre communications sont intégrées dans cette seconde partie dont trois publications (l'une publiée, les deux autres en préparation) et un poster (en Annexe 4) présenté en octobre 2012 au Congrès de l'European Society for Vector Ecology (Congrès E-Sove, Montpellier, France, 8-11 octobre 2012).

MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les babésioses (piroplasmoses) canines

1. Définition et historique

Les babésioses (piroplasmoses) sont des maladies émergentes, transmises par les tiques, dues à des protozoaires à localisation intra-érythrocytaire. Elles sont rencontrées chez de nombreuses espèces animales ainsi que chez l'homme et se traduisent le plus souvent par une anémie hémolytique plus ou moins grave en fonction des hôtes et des espèces. En 1888, le Docteur Victor Babeş (1854 - 1926), physicien et biologiste roumain, rapporta pour la première fois l'existence de micro-organismes localisés dans les érythrocytes et responsables d'hémoglobinuries chez des bovins (Babeş, 1888). Il identifia un peu plus tard des organismes similaires dans des globules rouges de moutons. Ces organismes ont été respectivement appelé *Babesia bovis* et *Babesia ovis* donnant ainsi naissance au genre *Babesia* (Uilenberg, 2006). En 1895, des organismes similaires furent détectés pour la première fois en Europe chez des chiens italiens (Roncalli Amici, 2001). Le premier cas humain fut décrit en 1957 (Vannier et Krause, 2009).

Deux formes distinctes du stade intra-érythrocytaire ont été mises en évidence et ont permis de classer les protozoaires de ce genre en deux groupes : les « grandes babésies » (3 à 5 μm) et les « petites babésies » (1 à 3 μm). Chez le chien, chez lequel les deux formes sont observées, il a été longtemps admis que seules les espèces *Babesia canis* (grande forme) et *Babesia gibsoni* (petite forme) étaient agents de babésioses (Boozer et Macintire, 2003). A ce jour, grâce à l'essor de la biologie moléculaire, 12 espèces distinctes, appartenant aux genres *Babesia* et *Theileria*, ont été identifiées chez des chiens dans le monde (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Toutefois, pour certaines de ces espèces, l'appartenance à l'un ou l'autre de ces genres reste controversée. Le nom de « piroplasma », responsable de l'appellation « piroplasmose » également donnée à la maladie, correspond à une dénomination plus ancienne liée au fait que les parasites, après multiplication, se présentent souvent en forme de poire. Ce terme permet ainsi de regrouper sous un même nom les maladies causées par des protozoaires des deux genres, *Babesia* et *Theileria* (Uilenberg, 2006).

2. Les agents de piroplasmoses

2.1. Taxinomie et répartition géographique

Les piroplasmes (genres *Babesia* et *Theileria*) sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* et à l'ordre des *Piroplasmida* (Irwin, 2009). Le genre *Babesia* contiendrait plus de 100 espèces capables d'infecter un large éventail de mammifères et quelques oiseaux (Homer et al., 2000; Lack et al., 2012). Les 12 espèces de piroplasmes détectées à ce jour chez des chiens dans le monde et leurs principales caractéristiques sont résumées dans les Tableaux 1 et 2 (d'après Irwin, 2009, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). La détection de certaines de ces espèces repose uniquement sur des méthodes de diagnostic moléculaire (Tableau 2). C'est notamment le cas des espèces qui parasitent habituellement d'autres hôtes vertébrés que le chien, comme *Theileria equi* et *Babesia caballi*, des protozoaires parasites des chevaux. La signification clinique et épidémiologique de telles infections reste inconnue (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011).

Tableau 1 : Piroplasmes du chien dont l'infection a été confirmée par observation microscopique des parasites.

Taille	Espèce	Synonymes	Vecteur	Répartition	Commentaires
"Grandes" babésies	<i>Babesia canis</i>	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ?	Europe	
	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i> ?	Mondiale, régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes	Maladie émergente dans le Nord et l'Est de l'Europe
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i> (autrefois <i>H. leachi</i>)	Afrique sub-saharienne et Afrique du Sud	Suspecté en France (Fritz, 2010)
	<i>Babesia</i> sp.	<i>Babesia</i> sp. (isolât de Caroline du Nord)	inconnu	Est et Sud-Est des USA	Détecté principalement chez des chiens immunodéprimés
	<i>Babesia</i> sp.		inconnu	Royaume-Uni	Une seule description
"Petites" babésies	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Babesia gibsoni</i> souche asiatique	<i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Haemaphysalis bispinosa</i> ? <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ?	Asie, maladie émergente dans le reste du monde	En dehors de l'Asie, l'infection par <i>B. gibsoni</i> est associée aux pit-bull terriers et autres chiens de
	<i>Babesia conradae</i>	<i>Babesia gibsoni</i> (premières descriptions)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> ?	Californie	Proche d'espèces infectant les Ongulés et l'homme
	<i>Babesia microti</i> -like	<i>Theileria annae</i> <i>Babesia</i> sp. (isolât Espagnol)	<i>Ixodes hexagonus</i> ? <i>Ixodes ricinus</i> ? <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ?	Nord de l'Espagne, Portugal Croatie Amérique du Nord	Principal foyer connu situé au nord-est de l'Espagne; identifié chez des renards en Croatie et aux USA

Tableau 2 : Piroplasmes du chien dont l'infection a été détectée uniquement par des méthodes moléculaires.

Espèce	Méthodes utilisées pour la détection	Hôte principal	Lieu de détection	Références
<i>Babesia caballi</i>	PCR et séquençage	Cheval	Croatie	Beck et al., 2009
	PCR-RFLP		France	Fritz, 2010
<i>Theileria</i> sp.	PCR, RLB et séquençage	Proche d'un piroplasma de l'antilope des sables	Afrique du Sud	Matijila et al., 2008b
<i>Theileria equi</i> (<i>Babesia equi</i>)	PCR et séquençage	Cheval	Espagne	Criado-Fornelio et al., 2003a
	PCR et séquençage		Croatie	Beck et al., 2009
	PCR-RFLP et séquençage ¹		France	Fritz, 2010

¹ Séquençage de confirmation pour un certain nombre d'échantillons. Les séquences n'ont pas été déposées dans Genbank.

Une spécificité étroite est généralement reconnue entre une espèce de piroplasma et une espèce de tique vectrice dans une zone géographique définie (Chauvin et al., 2009) suggérant une distribution superposable des protozoaires et de leurs vecteurs. De récentes études laissent penser que cette spécificité pourrait ne pas être aussi étroite que cela était pressenti (Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010). La caractérisation moléculaire des agents pathogènes a permis d'améliorer considérablement les connaissances sur la répartition des espèces de piroplasmes capables d'infecter le chien (Tableaux 1 et 2), de confirmer certaines associations vecteurs-pathogènes mais également d'en suspecter de nouvelles. Ces connaissances sont encore partielles du fait de l'utilisation encore limitée de l'outil moléculaire pour la réalisation d'enquêtes épidémiologiques de grande ampleur et de son utilisation quasi inexistante sur le terrain. Toutefois, pour un certain nombre d'espèces, une cartographie globale peut-être établie. *B. canis*, transmise par *D. reticulatus*, est le plus souvent retrouvée dans les régions tempérées d'Europe. *Babesia vogeli* a une distribution mondiale semblable à celle de son vecteur *R. sanguineus* alors que *B. rossi* resterait limitée à l'Afrique (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). *B. gibsoni*, quant-à-elle, dont le foyer historique se trouve en Asie, est désormais considérée comme une espèce émergente dans le reste du monde et est souvent associée dans ces régions à des populations de chiens de combats. Pour les autres espèces, les descriptions sont encore très limitées pour faire état de leur répartition et les vecteurs impliqués dans leur transmission restent à confirmer.

Les co-infections par plusieurs espèces de piroplasmes sont rares mais semblent possibles. En Afrique du Sud, deux cas de co-infection impliquant *Babesia vogeli* et *Babesia rossi* pour le premier et *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* et *Ehrlichia canis* pour le second ont

été mis en évidence lors d'une enquête impliquant 560 chiens (Matjila et al., 2008a). Au Nigeria, un cas de co-infection par *Babesia canis* et *Babesia rossi*, confirmé par observation microscopique d'organismes de tailles variables dans les hématies, PCR spécifique et séquençage, a été mis en évidence chez un chien sans antécédent de déplacement (Kamani et al., 2010).

2.2. Phylogénie

L'utilisation des outils moléculaires modernes a permis une meilleure compréhension des relations phylogénétiques au sein des *Piroplasmida*. Toutefois, les hypothèses évolutives avancées demeurent incertaines et controversées. A ce jour, les études phylogénétiques se sont concentrées essentiellement sur l'analyse du gène de l'ARN ribosomal 18S. Allsopp et collaborateurs ont été les premiers à étudier les relations phylogénétiques et évolutives des piroplasmes à partir d'un nombre limité de séquences des genres *Babesia*, *Theileria* et *Cytauxzoon* (Allsopp et al., 1994). D'autres auteurs ont par la suite complété ces données phylogénétiques (Criado-Fornelio et al., 2003b; Lack et al., 2012). Il ressort de ces analyses qu'une grande variabilité génétique existe au sein des *Piroplasmida*. Si les premières analyses mettaient en avant l'existence au sein des piroplasmes de deux groupes bien distincts d'espèces, le groupe *Babesia* et le groupe *Theileria* (Allsopp et al., 1994), celles qui suivirent conclurent à une organisation bien plus complexe, pouvant atteindre jusqu'à 5 à 8 groupes monophylétiques. Ces analyses permettent toutefois d'émettre des hypothèses évolutives intéressantes. Certains auteurs ont suggéré que les piroplasmes pourraient avoir une origine Africaine tout comme les tiques (Criado-Fornelio et al., 2003b; Penzhorn et al., 2001). Le groupe le plus ancestral, auquel appartiendraient les espèces *Babesia rodhaini*, *Babesia leo*, *Babesia felis*, *Babesia microti* et *Theileria annae*, aurait été initialement parasite de rongeurs et des ancêtres des carnivores pour former par la suite les lignées comprenant les espèces du genre *Theileria*. De ces dernières auraient enfin dérivé les espèces du genre *Babesia* des carnivores et des ongulés (Criado-Fornelio et al., 2003b). Ces hypothèses évolutives sont illustrées sur la Figure 1.

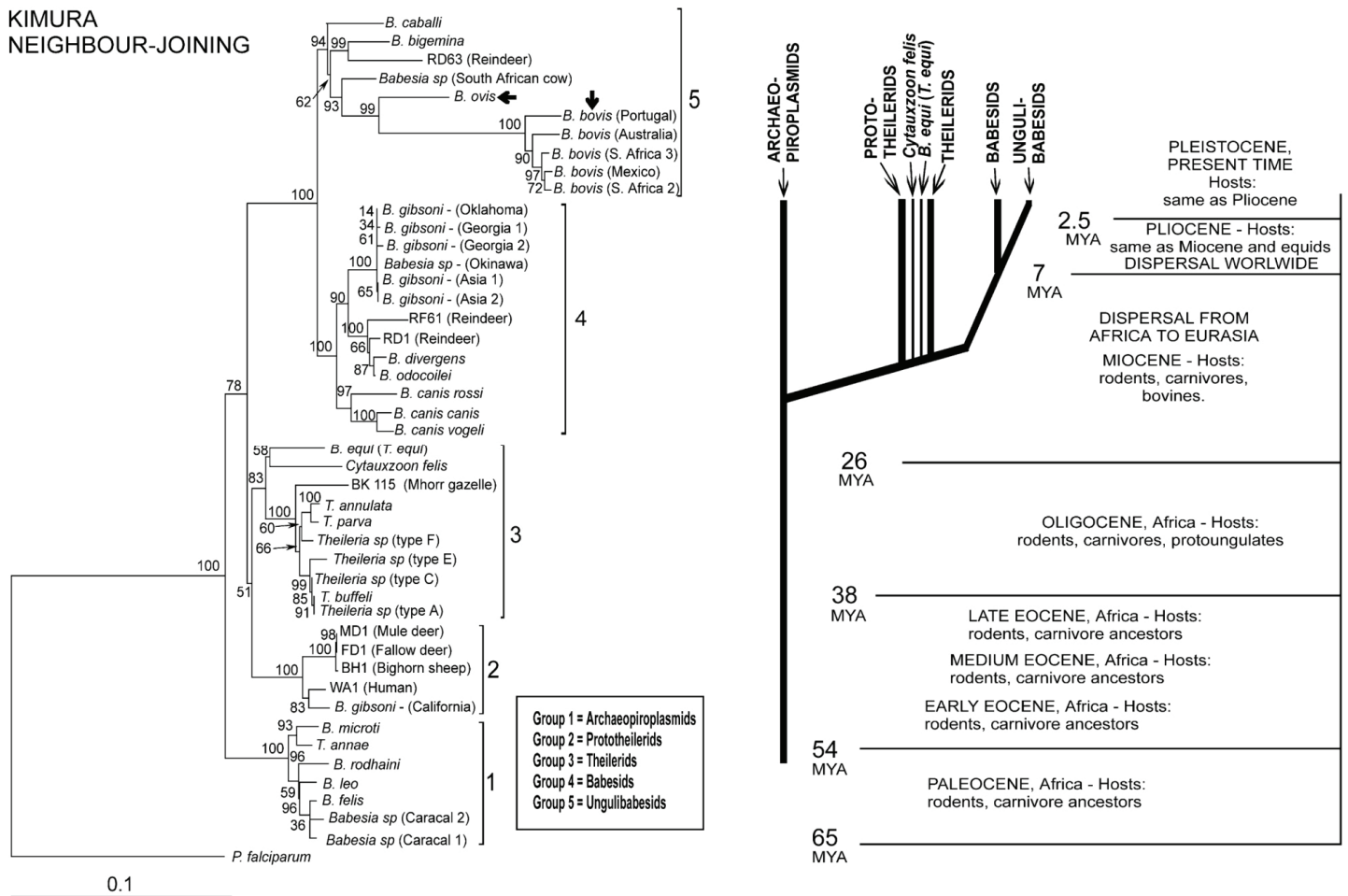


Figure 1 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences partielles (1621 paires de bases) du gène de l'ARNr 18S de 45 espèces des genres *Babesia* et *Theileria* de mammifères (à gauche) et hypothèses évolutives (à droite) d'après Criado-Fornelio et al., 2003b. Cette analyse phylogénétique montre l'évolution probable des piroplasmes depuis les groupes les plus ancestraux (Archéopiroplasmidés, groupe 1) jusqu'aux plus récents (Babésidés des ongulés, groupe 5). MYA : Millions d'années.

Si l'on peut identifier, dans toutes ces études, des associations constantes telles que le rapprochement génétique de la plupart des espèces du genre *Babesia* du chien d'une part, et des ongulés d'autre part, une grande variabilité peut être constatée quant à la topologie des arbres phylogénétiques présentés. La topologie des arbres dépend notamment des séquences sélectionnées, des fragments de gènes amplifiés et des méthodes employées pour leur construction. Des analyses similaires portant sur d'autres gènes seront nécessaires à l'avenir pour apporter plus de puissance aux reconstitutions phylogénétiques établies.

2.3. Morphologie

Parmi les protozoaires, les *Apicomplexa* se caractérisent entre autre par l'absence d'organite locomoteur et la présence d'un complexe apical à certains stades (Bussi  ras et Chermette, 1992). Ce complexe apical, visible uniquement en microscopie électronique à transmission (Figure 2), servirait à la pénétration dans la cellule-hôte. Au sein de ce complexe apical, les rhoptries, éléments allongés en massue, joueraient un rôle sécrétoire d'enzymes protéolytiques (Bussi  ras et Chermette, 1992).

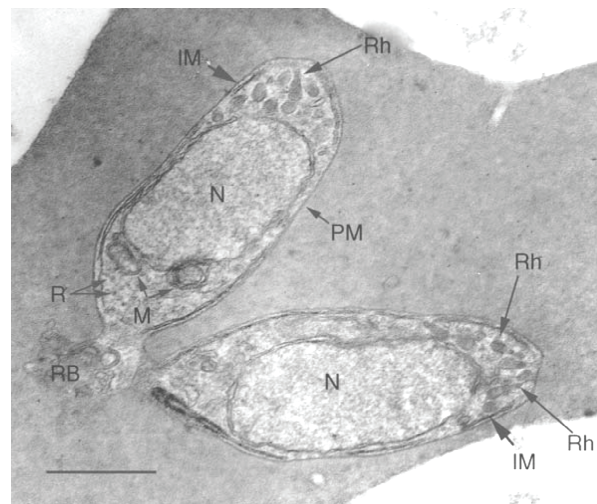


Figure 2 : Image au microscope électronique à transmission de deux mérozoïtes de *Babesia conradae* en division dans un globule rouge de chien. Chaque mérozoïte est constitué d'une membrane plasmique (PM), d'un noyau (N), d'une ou deux mitochondrie(s) (M) et d'un complexe apical composé d'une membrane plasmique interne (IM) et de rhoptries (Rh). Les deux mérozoïtes sont attachés par un corps résiduel (RB). Echelle: 5   m (Kjemtrup et al., 2006).

En fonction de la taille du stade intra-érythrocytaire, deux groupes appelés respectivement « grandes babésies » (3    5   m donc de taille supérieure au rayon de l'hématie) et « petites babésies » (1    3   m donc de taille inférieure au rayon de l'hématie), sont distingués (Figure 3). Différentes formes peuvent être observées dans les hématies en fonction du stade de développement et des espèces concernées. Les plus couramment rencontrées sont (i) des éléments allongés en forme de poire dites « piriformes » par deux ou

multiples de deux, (ii) des formes circulaires amiboïdes uniques ou multiples, (iii) des tétrades ou « croix de malte » et (iv) des éléments en bâtonnets (plus rares).

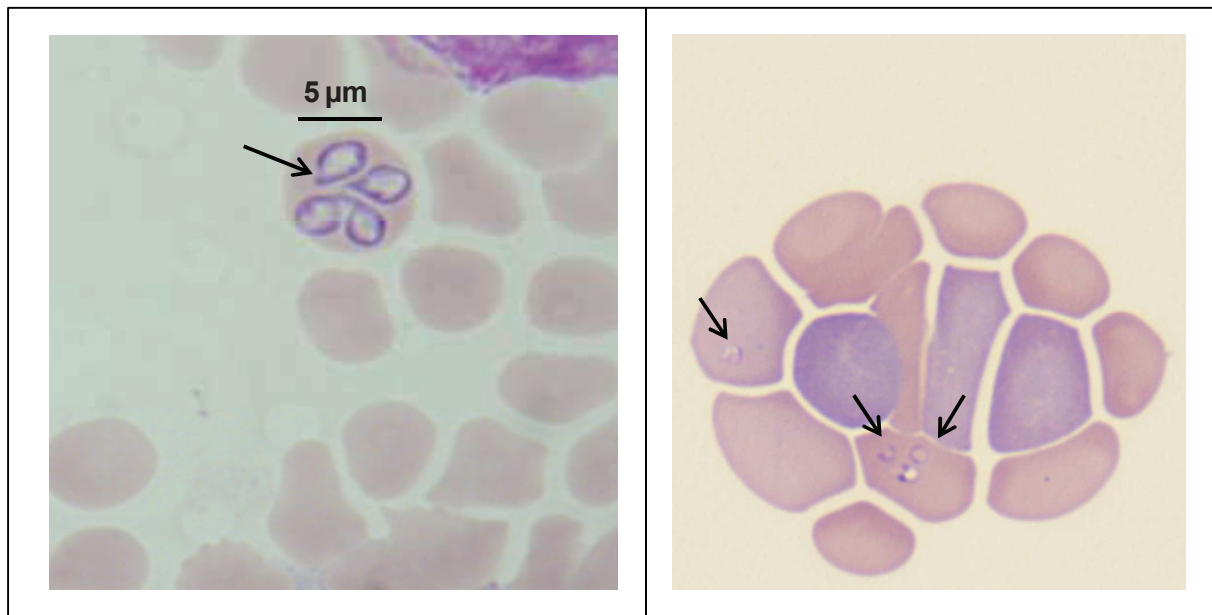


Figure 3: Morphologie « typique » de « grands » et « petits » piroplasmes (indiqués par les flèches) dans des hématies de chien au microscope optique après coloration May-Grünwald-Giemsa d'un étalement de sang. A gauche, éléments dits « piriformes » de grandes babésies - *Babesia vogeli* (VetAgro Sup, France). A droite, éléments circulaires de petites babésies - *Babesia gibsoni* (Dr Nobuyuki Shiranaga, Yamaguchi, Japon).

2.4. Cycles biologiques

2.4.1. *Babesia* sp.

Les protozoaires du genre *Babesia* présentent un cycle dixène. Pour une partie de leur cycle, ils se multiplient de manière asexuée dans les globules rouges de vertébrés (qui jouent ainsi le rôle d'hôtes intermédiaires). Ils sont ensuite acquis à la faveur d'un repas sanguin et se développent chez une tique de la famille des *Ixodidés* dans laquelle se produit une reproduction sexuée (qui joue ainsi le rôle d'hôte définitif). Pour illustrer les grandes étapes du développement des protozoaires du genre *Babesia*, nous utiliserons l'exemple du cycle parasite de *Babesia canis* (Figure 4), dont l'hôte intermédiaire est une tique de l'espèce *Dermacentor reticulatus* et l'hôte définitif le chien. Les différentes étapes du cycle sont indiquées par des numéros entre parenthèses.

2.4.1.1. Développement chez l'hôte vertébré

L'infection du chien par *B. canis* se produit lors d'une morsure de tique qui injecte des sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires parasitées (étape 1 de la Figure 4). Après passage dans la circulation sanguine, les parasites pénètrent activement dans des globules rouges. Tous les stades parasitaires se développent à l'intérieur des globules rouges chez l'hôte vertébré. Chaque sporozoïte produit alors deux (et multiples de 2) mérozoïtes par division binaire (étape 2). Après lyse des érythrocytes, les mérozoïtes libérés envahissent de nouveaux érythrocytes par endocytose et produisent de nouveaux mérozoïtes par mérogonies successives (étape 3) (Homer et al., 2000).

2.4.1.2. Développement chez la tique

Lorsque des globules rouges infectés par des babésies sont ingérés par une tique à la faveur d'un repas de sang, la plupart des parasites dégènèrent et sont détruits (étape 4). Cependant, certains stades spécifiques (appelés « pré-gamétocytes ») survivent (étape 5) et poursuivent leur développement pour évoluer en gamétocytes (étape 6) (Chauvin et al., 2009; Mehlhorn et Schein, 1984). C'est dans la lumière intestinale de la tique qu'a lieu la transformation en gamètes (étape 7) dits « corps rayonnants », « ray-bodies » ou « strahlenkörper » (corps cellulaires avec une épine et des protrusions cytoplasmiques). Les gamètes fusionnent dans la lumière du tube digestif de la tique (étape 8) pour former un zygote (étape 9) qui pénètre dans les cellules de l'épithélium digestif et se transforme en un ookinète mobile (étape 10). Une nouvelle phase de multiplication appelée « sporogonie » débute alors. L'ookinète ressort des cellules de l'épithélium intestinal, et envahit différents organes de la tique donnant ainsi naissance à de nouveaux kinètes (étape 11) qui peuvent migrer par la suite dans tout le corps de la tique via l'hémolymphe. L'invasion des ovaires résulte en la production de nombreux œufs infectés (transmission transovarienne) (Chauvin et al., 2009; Homer et al., 2000). La sporogonie se poursuit chez tous les stades de la génération n+1 (larve, nymphe et adulte). Ce processus est rendu possible par le passage des protozoaires d'un stade à l'autre par transmission trans-stadiale (Chauvin et al., 2009). L'infection par des babésies peut ainsi persister sur plusieurs générations, même en l'absence d'un nouveau repas sanguin infectieux (Uilenberg, 2006). Dans les glandes salivaires, le parasite entame un développement particulier (étape 12). Les sporokinètes infectent les cellules des acini et se différencient en sporoblastes puis en sporozoïtes sous l'influence d'un nouveau repas sanguin (Homer et al., 2000). Ces sporozoïtes correspondent au nouveau stade infectant pour l'hôte

vertébré. La succession chez la tique et l'hôte intermédiaire de phases de multiplications sexuées et asexuées est responsable d'une évolution génétique et antigénique des parasites. Le polymorphisme des antigènes de surface des babésies permet aux parasites d'échapper au système immunitaire des hôtes (Chauvin et al., 2009).

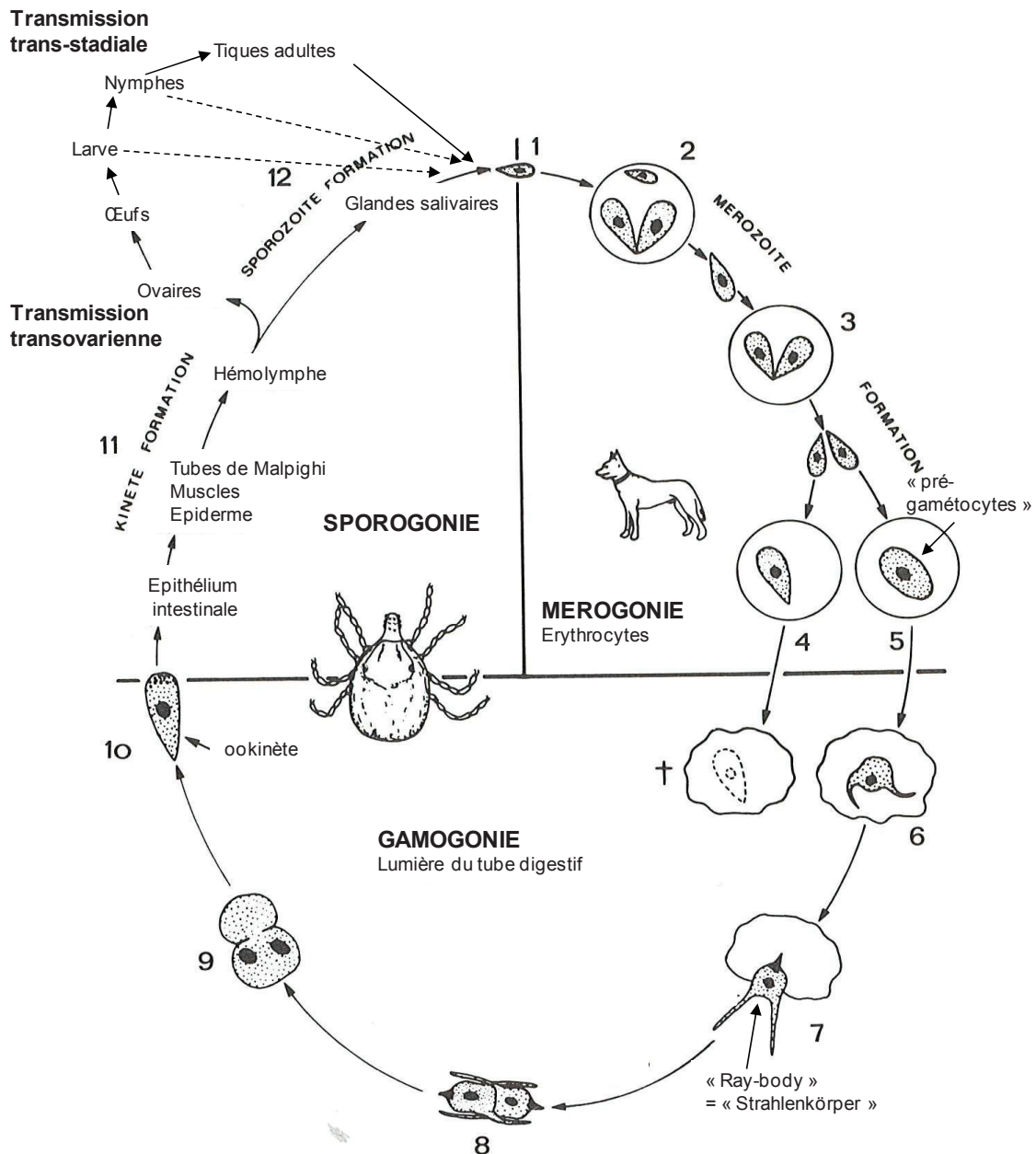


Figure 4 : Cycle de développement de *Babesia canis* chez ses hôtes, vertébré et arthropode (modifié d'après Mehlhorn et Schein, 1984). Les différentes étapes du cycle sont numérotées de 1 à 12.

2.4.2. *Theileria* sp.

Le cycle des protozoaires du genre *Theileria* est semblable en grande partie à celui des babésies. Toutefois, quelques différences sont à noter. Lorsque qu'un vertébré est piqué par une tique porteuse de *Theileria*, les sporozoïtes ne pénètrent pas directement dans les globules rouges mais passent par une étape préliminaire d'infection de leucocytes (lymphocytes ou macrophages), dans les ganglions lymphatiques, dans lesquelles ils se transforment en schizontes (Mehlhorn et Schein, 1984; Uilenberg, 2006). Les mérozoïtes ensuite libérés envahissent les globules rouges et se multiplient par bourgeonnement formant ainsi des tétrades en forme de « croix de Malte ». Chez le vecteur, les étapes se produisant après la formation de zygotes mobiles diffèrent entre les genres *Babesia* et *Theileria*. Notamment, le cycle de développement des protozoaires du genre *Theileria* chez la tique ne produit pas de formes capables d'envahir les organes et en particulier les ovaires. Ainsi, la transmission transovarienne n'est pas décrite pour ce genre (Uilenberg, 2006). Comme pour les piroplasmes du genre *Babesia*, la maturation des sporozoïtes dans les glandes salivaires est déclenchée par la morsure de la tique infectée et une transmission trans-stadiale est possible (Mehlhorn et Schein, 1984; Uilenberg, 2006). Il est à noter toutefois que, pour les parasites du genre *Theileria*, les tiques perdent leur infection une fois le parasite transmis (Uilenberg, 2006) et, par conséquent, qu'une seule transmission d'un stade « n » au stade « n+1 » n'est possible (Uilenberg, 2006). Ainsi, les larves ne sont-elles jamais infectantes et seule l'infection d'une larve ou d'une nymphe peut conduire à un stade « n+1 » (nymphe ou adulte) infectant. Il n'y a donc pas amplification d'une génération à l'autre.

2.4.3. Transmission et facteurs de modulation

La transmission des agents pathogènes se produit le plus souvent à la faveur d'une morsure de tique. La transmission des sporozoïtes des glandes salivaires de la tique au chien intervient le plus souvent entre 2 à 3 jours après la fixation de la tique (Martinod et al., 1985). Ce délai entre morsure et transmission, commun aux genres *Babesia* et *Theileria*, s'explique par le fait que la maturation des sporoblastes présents dans les glandes salivaires en sporozoïtes infectants est déclenchée par la prise du repas de sang (Uilenberg, 2006). Le temps pendant lequel la tique est fixée à son hôte affecte ainsi directement l'efficacité de la transmission des sporozoïtes. Un gorgement jusqu'à réplétion peut conduire à un risque d'infection qui approche les 100% (Homer et al., 2000). D'autres modes de transmission tels que des transmissions verticale ou horizontale à l'occasion de morsures (chez les chiens de

combat notamment) ou de transfusions sont suspectés (Ayoob et al., 2010; Boozer et Macintire, 2003; Irwin, 2010).

Des mécanismes moléculaires complexes (détaillés dans une revue de Chauvin et al., 2009), dont de nombreux restent à élucider, sont induits par l'infection de piroplasmes tant chez l'hôte vertébré que chez le vecteur. L'infection peut induire à des modifications de la réponse immunitaire de l'hôte et favoriser la transmission par l'arthropode vecteur. Le risque d'infection peut également dépendre de facteurs géographiques. L'existence d'une transmission transovarienne et trans-stadiale et l'amplification parasitaire qui en résultent conduisent parfois à l'existence de véritable « foyers » de babésioses centrés sur de petits biotopes alors que des zones proches restent indemnes (Bourdoiseau, 2006). Le maintien de ces « foyers » est favorisé par une spécificité étroite entre la tique vectrice et son hôte. Ainsi, pour *R. sanguineus*, les caractères endophile et spécifique pour le chien de cette espèce peuvent s'avérer particulièrement efficaces pour le maintien de foyers d'infections à *B. vogeli* (Chauvin et al., 2009).

3. Répercussions cliniques et pouvoir pathogène

Chez le chien, les répercussions cliniques de l'infection par des piroplasmes dépendent de divers facteurs dont les principaux sont l'espèce infectante, l'âge et le statut immunitaire de l'hôte ou encore la présence d'infections intercurrentes (Boozer et Macintire, 2003; Irwin, 2010). Les jeunes chiens ont tendance à développer des maladies plus sévères que les adultes (Irwin, 2010). L'immunodépression et la splénomégalie augmentent le risque de développer la maladie (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). L'infection d'un chien par des piroplasmes peut ainsi se traduire par une grande variété de symptômes allant du portage asymptomatique à des déficiences multiples d'organes pouvant conduire à la mort.

Dans le cas des protozoaires du genre *Babesia*, l'infection débute par l'invasion des globules rouges. Cette invasion est responsable d'une destruction plus ou moins massive des érythrocytes se traduisant chez l'animal par l'apparition d'une anémie hémolytique. Cette destruction des érythrocytes est d'origine multifactorielle. Elle résulte de la lyse directe des hématies lors de la réplication intracellulaire des parasites mais fait également intervenir des mécanismes plus complexes tels que des phénomènes immunitaires, oxydatifs ou une encore augmentation de la phagocytose des globules rouges (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). De nombreux cas de babésioses se traduisent également par une thrombopénie dont l'origine n'est pas toujours clairement identifiée (Solano-Gallego et Baneth, 2011). L'anémie

et le choc hypotensif qui en résulte sont responsables de l'apparition d'une hypoxie tissulaire secondaire pouvant conduire à des défaillances organiques parfois dramatiques (Solano-Gallego et Baneth, 2011). Les babésioses sont qualifiées de non compliquées lorsque les symptômes accompagnant l'infection ne sont liés qu'à l'anémie. Les symptômes habituellement décrits lors de babésioses non compliquées sont la fièvre, une pâleur des muqueuses voire de l'ictère, de l'anorexie, de l'abattement, de la tachycardie, une splénomégalie et une pigmenturie. Les babésioses sont qualifiées de compliquées lorsque qu'interviennent, en plus de l'anémie, le dysfonctionnement d'un ou plusieurs organes (foie, rein, cœur, système nerveux central, etc.), un syndrome inflammatoire systémique et une mortalité plus élevée (Ayoob et al., 2010; Irwin, 2010; Matijatko et al., 2012). Certains auteurs rapprochent cette forme compliquée de la maladie du paludisme (Irwin, 2010). Elle peut s'accompagner de symptômes divers et variés en fonction des organes atteints tels qu'une insuffisance rénale aiguë, des troubles neurologiques, une hypotension grave, une détresse respiratoire.

La gravité des répercussions cliniques dépend de l'espèce de parasite infectante. Parmi des grandes babésies, *Babesia rossi* est l'espèce responsable des répercussions cliniques les plus graves. Les formes compliquées sont plus fréquentes et la mortalité intervient dans plus de 30% des cas chez les chiens atteints de ces formes (Jacobson, 2006). *Babesia canis* est responsable d'une atteinte modérée à sévère. Dans certains pays d'Europe (en Hongrie notamment), les formes compliquées sont plus fréquentes laissant suspecter l'existence de souches plus virulentes de *B. canis* dans ces régions (Matijatko et al., 2012). Des portages asymptomatiques sont possibles, la prévalence de ces portages reste inconnue (Welc-Faleciak et al., 2009). *Babesia vogeli* est généralement considérée comme la moins pathogène des babésies. Si l'anémie hémolytique est fréquemment décrite pour cette espèce, les répercussions cliniques et pathologiques de l'infection sont qualifiées d'inconstantes (Solano-Gallego et al., 2008). Elle serait ainsi responsable, le plus souvent, d'atteintes sub-cliniques à modérées plus fréquentes lors d'infections intercurrentes ou chez des chiens splénectomisés (Carret et al., 1999; Uilenberg et al., 1989). Des anémies hémolytiques sévères et fatales ont toutefois été rapportées chez de jeunes chiens (Solano-Gallego et al., 2008). Des portages asymptomatiques sont également décrits (Beck et al., 2009; Hamel et al., 2009). Enfin, une grande babésie (*Babesia* sp.), détectée pour la première fois en 2002 en Caroline du Nord (Birkenheuer et al., 2004b) semble atteindre préférentiellement les chiens immunodéprimés, notamment à la suite d'une splénectomie ou d'une chimiothérapie (Sikorski et al., 2010).

Les signes cliniques accompagnant les infections par les petites babésies sont généralement plus graves. L'infection par *Babesia gibsoni* se caractérise par une évolution souvent chronique (infection sub-clinique, fatigabilité et perte de poids) et une élimination souvent incomplète des parasites malgré un traitement approprié qui se traduit par des rechutes plus ou moins fréquentes (Solano-Gallego et Baneth, 2011). Les répercussions cliniques de l'infection par *Babesia conradae*, semblent proches de celles de *Babesia gibsoni*. Toutefois, l'anémie est plus prononcée et la mortalité plus élevée (Kjemtrup et Conrad, 2006). Enfin, l'infection par *Babesia microti*-like (également appelée *Theileria annae*) se traduirait par une atteinte grave, souvent compliquée d'une azotémie, dont le pronostic doit être réservé (García, 2006).

4. Diagnostic expérimental

Le diagnostic de certitude de l'infection par des piroplasmes requiert la mise en évidence des parasites dans les globules rouges (Ayoob et al., 2010). La détection des parasites sur un étalement de sang coloré (colorations de Giemsa ou de Wright) observé au microscope optique a pendant longtemps été l'unique méthode de diagnostic utilisée (Irwin, 2009; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Cette méthode est fiable lorsque la parasitémie est modérée ou élevée. Cependant, la gravité de l'atteinte clinique n'est pas toujours corrélée à une parasitémie élevée (Boozer et Macintire, 2003; Solano-Gallego et Baneth, 2011). L'utilisation de cette méthode pour la mise en évidence de porteur asymptomatique est un véritable challenge compte tenu de la parasitémie souvent faible ou intermittente observée chez ces individus (Solano-Gallego et Baneth, 2011). La réalisation d'un étalement de sang à partir de sang périphérique (prélevé à l'oreille ou au niveau du lit de l'ongle) ou l'examen de buffy coat améliorent la sensibilité de détection (Ayoob et al., 2010). L'utilisation de techniques de cytométrie en flux offre une sensibilité similaire à l'évaluation microscopique pour la détection des réticulocytes ou des érythrocytes matures infectés (Fukata et al., 1996; Uemura et al., 1990).

La sérologie (IFI, ELISA) peut-être utilisée pour le diagnostic de l'infection par des piroplasmes. Cette méthode souffre toutefois d'un manque de spécificité et des réactions croisées sont possibles avec d'autres protozoaires parasites (Solano-Gallego et Baneth, 2011). De plus, cette méthode indiquant une infection passée, présente ou persistante, peut rendre difficile l'interprétation de résultats positifs en zone d'endémie. Enfin, des cas de faux négatifs peuvent être rencontrés chez les très jeunes animaux ou en tout début d'infection.

Les méthodes utilisant la biologie moléculaire, en particulier les PCR classiques, nichées (double amplification), combinées à la RFLP (digestion des produits d'amplification par des enzymes de restriction) ou encore la RLB (utilisant des sondes) sont celles qui à ce jour offrent les meilleures sensibilité et spécificité. Elles permettent la mise en évidence de l'infection avec une sensibilité proche de 100% (Ayoob et al., 2010). En outre, elles sont les seules à permettre de caractériser d'éventuelles co-infections lorsqu'elles se produisent (Kamani et al., 2010). Certaines méthodes de PCR nichées ont montré une capacité à détecter une parasitémie évaluée à $2,7.10^{-7}$ % (Jefferies et al., 2007). L'utilisation d'enzymes de restriction (RFLP) sur les produits d'amplification de PCR génériques ciblant le gène de l'ARNr 18S permet de discriminer les espèces de babésies du chien les plus fréquemment rencontrées (Carret et al., 1999; Jefferies et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2008). Cette caractérisation d'espèces est indispensable à la mise en place d'un traitement adapté. Les méthodes de PCR-RFLP se heurtent toutefois au risque de détection et donc de confusion de nouvelles espèces présentant des profils de restriction similaires à ceux d'espèces déjà connues. Seuls la PCR puis le séquençage permettent alors une caractérisation de certitude. Ces méthodes sont de plus en plus souvent utilisées dans le cadre d'études épidémiologiques.

5. Traitement et prévention

5.1. Traitement

L'imidocarbe (sous forme de dipropionate) reste la molécule de choix pour le traitement des babésioses canines cliniques. Une dose unique de 5 à 6,6 mg/kg par voie intramusculaire (pouvant être renouvelée 14 jours plus tard) est actuellement préconisée pour le traitement des babésioses canines dues aux grandes babésies (Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Cette dose est supérieure à celle indiquée sur l'AMM de la spécialité (Carbesia®) actuellement disponible pour le traitement des babésioses canines en France (2 à 3 mg/kg). L'injection est souvent douloureuse et des effets secondaires, liés à l'activité anticholinestérasique du produit, sont possibles (Ayoob et al., 2010). L'acéturate de diminazène à la dose de 3 à 5 mg/kg, utilisé pour le traitement des babésioses et des trypanosomoses dans de nombreux pays du monde, est considéré comme la molécule la plus efficace contre les grandes babésies (Ayoob et al., 2010). Son utilisation doit cependant être envisagée avec prudence car elle ne bénéficie que d'une faible marge de sécurité et la réponse est variable en fonction des individus (Solano-Gallego et Baneth, 2011).

Les petites formes résistent souvent aux traitements conventionnels. La stérilisation parasitaire n'est généralement pas obtenue malgré des traitements adaptés et les rechutes sont fréquentes. L'association de l'atovaquone (anti-paludéen) et de l'azithromycine (antibiotique macrolide) est conseillée comme méthode alternative pour le traitement de l'infection par *B. gibsoni* (Birkenheuer et al., 2004a). La clindamycine à la dose de 25 mg/kg toutes les 12 h a montré une efficacité partielle sur *B. gibsoni*. Associée au métronidazole (15 mg/kg toutes les 12 h *per os*) et à la doxycycline (5 mg/kg toutes les 12 h *per os*), elle a permis de normaliser cliniquement des chiens porteurs de *B. gibsoni* et de faire disparaître les parasites dans le sang périphérique (Irwin, 2009). Récemment, un protocole utilisant du phosphate de clindamycine à la dose de 30 mg/kg toutes les 12 h, une injection par voie intra-musculaire d'acéturate de diminazène à la dose de 3,5 mg/kg, et une injection sous-cutanée d'imidocarbe (sous forme de dipropionate) à la dose de 6 mg/kg 24 h après la précédente a donné des résultats très prometteurs pour le traitement et la prévention des rechutes sur la souche asiatique de *B. gibsoni* (Lin et al., 2012). Des traitements complémentaires (fluidothérapie, transfusions, anti-inflammatoires) peuvent être envisagés en fonction de cas et des atteintes.

5.2. Prévention

La prévention de l'infection par des piroplasmes repose essentiellement sur le contrôle de l'infestation par les tiques vectrices. L'utilisation de topiques acaricides (et/ou répulsifs ou limitant l'attachement) est la méthode la plus efficace. Elle peut-être associée à une inspection régulière du pelage puisque 2 à 3 jours de gorgement sont généralement requis avant que se produise la transmission des parasites (Martinod et al., 1985). De nombreuses molécules telles que les pyrethroïdes (deltaméthrine, perméthrine et cyperméthrine), l'amitraz, le fipronil ou le carbaryl ont prouvé leur efficacité acaricide et sont disponibles sur le marché. Les applications doivent cependant être renouvelées de manière régulière pour assurer une couverture efficace dans le temps. L'usage à grande échelle de ces molécules n'est pas sans conséquence. Elles peuvent s'avérer toxiques pour l'animal ou l'environnement ou favoriser l'apparition de résistances. Aussi, l'utilisation de méthodes biologiques sont-elles actuellement à l'étude pour le contrôle des vecteurs dans l'environnement (Fernandes et al., 2012). L'utilisation périodique de traitements à l'imidocarbe ou à la doxycycline n'est pas recommandée pour prévenir la maladie (Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Deux vaccins contre la babésiose canine sont actuellement disponibles en Europe. Le premier est composé d'antigènes de *B. canis* alors que le deuxième associe des antigènes de *B. canis*

et de *B. rossi*. Ces deux vaccins n'induisent qu'une protection partielle contre *Babesia canis* qui se manifeste par une diminution de la sévérité des signes cliniques, de la parasitémie et de la durée de l'infection. L'efficacité de ces vaccins vis-à-vis des autres espèces de piroplasmes est partielle ou inconnue. Une prévention des autres modes de transmission, notamment la transmission par transfusion, peut également être envisagée grâce à la recherche systématique de parasites dans le sang d'animaux donneurs (Wardrop et al., 2005).

6. Les babésioses canines en Europe et en France

6.1. En Europe

En Europe, le nombre d'études épidémiologiques sur la babésiose canine ayant associé un échantillonnage représentatif et une caractérisation moléculaire des agents étiologiques est limité (Solano-Gallego et Baneth, 2011). Les informations obtenues ne peuvent en aucun cas permettre d'estimer une prévalence d'infection par espèce. A ce jour, quatre espèces de piroplasmes du chien, *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* et *Theileria annae* (ou *B. microti-like*), ont été détectées et caractérisées sur le plan moléculaire en Europe. Leur distribution est présentée sur la Figure 5. Parmi ces espèces, *B. canis*, est de loin l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les régions tempérées d'Europe. Son aire de répartition correspond globalement à celle du vecteur *Dermacentor reticulatus*. Un premier cas autochtone a été mis en évidence en Norvège suggérant une possible extension de la maladie vers des territoires plus au Nord (Øines et al., 2010). *B. vogeli* est plus fréquemment détectée dans le bassin méditerranéen où sévissent préférentiellement les tiques de l'espèce *R. sanguineus* alors que *Babesia microti-like* (également appelée *Theileria annae*) et *B. gibsoni* font l'objet de descriptions plus anecdotiques et leur vecteur n'est pas connu. Des infections de chiens par *Theileria equi* et *Babesia caballi*, des piroplasmes infectant habituellement les chevaux, ont été décrites de manière sporadique (Beck et al., 2009; Criado-Fornelio et al., 2003a; Fritz, 2010). La signification clinique et épidémiologique de telles infections reste inconnue (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Enfin, une étude, conduite en France entre 2006 et 2008, met en avant la détection par PCR-RFLP du pathogène *B. rossi* chez un chien sans antécédent connu de déplacement (Fritz, 2010). Les informations sur ce cas étant incomplètes (pas de confirmation de l'identification de l'agent pathogène par séquençage notamment), il n'est pas possible de conclure avec certitude sur la présence de cette espèce en Europe.

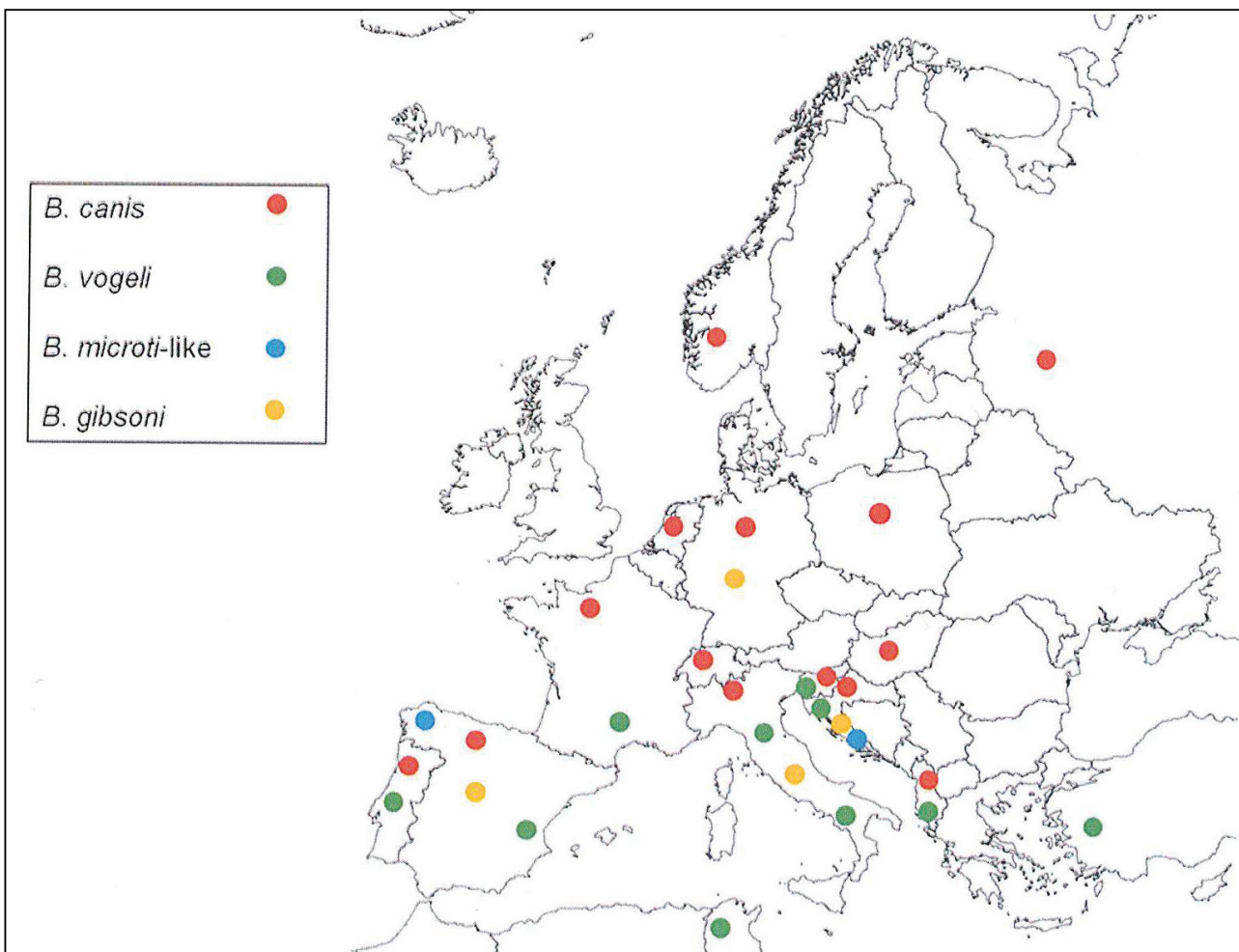


Figure 5 : Distribution des espèces de piroplasmes du chien en Europe sur la base de criblages moléculaires (Solano-Gallego et Baneth, 2011)

6.2. En France

En France, la babésiose canine est une maladie fréquente avec des pics d'observations marqués en fonction des saisons (Bourdoiseau, 2006). La prévalence moyenne a été estimée à 1,42 % en 2005 (Lasbleiz, 2007). Des cartes de distribution des cas de piroplasmose canine, construites à partir de questionnaires envoyés à des vétérinaires visant à déterminer le nombre moyen de cas observés par clientèle par an sont présentées sur la Figure 6. Ces enquêtes rapportent les résultats des réponses fournies par 1001 vétérinaires entre novembre 2003 et novembre 2004 (Bourdoiseau et Renard, 2005) et 892 clientèles vétérinaires françaises en 2005 (Lasbleiz, 2007). Des incidences plus élevées sont généralement retrouvées dans le Sud-Ouest du pays, dont l'Ouest du bassin méditerranéen, alors que les départements du littoral de

la Manche, l'Est du bassin méditerranéen et la Corse semblent peu touchés (Bourdoiseau et Renard, 2005; Lasbleiz, 2007).

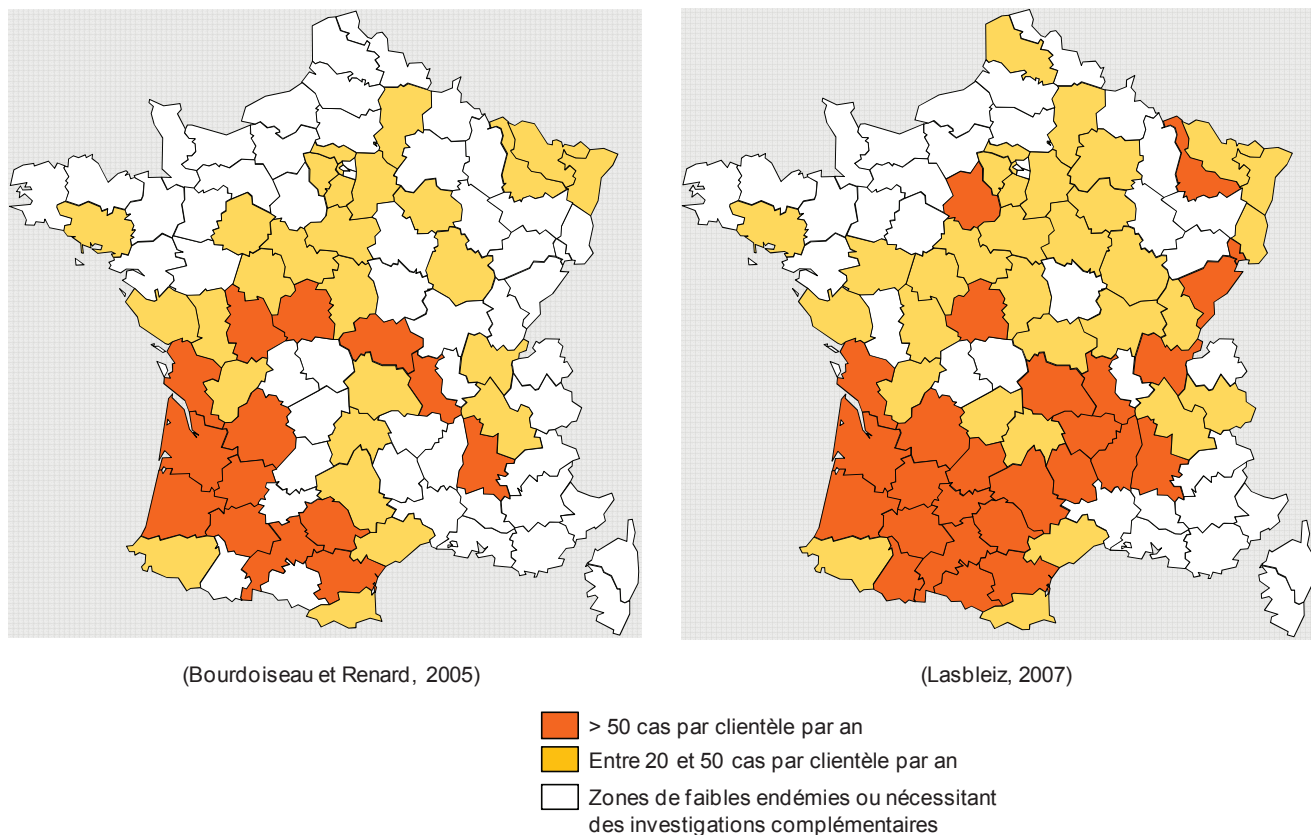


Figure 6 : Répartition des cas de piroplasmose canine en France

Une surveillance conduite sur 12 mois dans le Jura a montré une corrélation entre l'apparition de cas de babésioses canines et l'activité des tiques *Dermacentor reticulatus* dans cette région avec des incidences plus élevées à l'automne et au printemps (Martinod et Gilot, 1991). Si la mise en évidence de grandes formes de babésies sur les étalements de sang de chiens cliniquement suspects est la plus fréquente en France, 43% des vétérinaires reconnaissent avoir déjà observé des formes « très petites » (Lasbleiz, 2007). Cependant, la mise en évidence des petites formes étant plus difficile, il est possible que ces formes soient sous-diagnostiquées ou sur-diagnostiquées (confondues avec des artéfacts). Un seul cas de piroplasmose impliquant des petites babésies a été publié à ce jour en France (Boussarie, 1982).

Les études ayant abouti à une détection et une caractérisation moléculaire des piroplasmes circulant sur le territoire français restent limitées. En 2000-2001, l'analyse des sangs de 11 chiens européens de diverses origines a permis de mettre en évidence pour la

première fois en France, par PCR et séquençage, le pathogène *Babesia vogeli* dans le sang d'un chien italien qui aurait acquis son infection en France dans la région de Nantes (Cacciò et al., 2002). Le suivi des animaux entrant en Grande-Bretagne entre avril 2001 et juillet 2002 a permis de confirmer l'infection de 5 chiens d'origine française par *Babesia canis (canis)* par séquençage des produits de PCR (Shaw et al., 2003). En 2001-2002, l'analyse de 632 sangs de chien et de 214 tiques prélevés en régions Provence-Côte d'Azur et Languedoc-Roussillon a permis de mettre en évidence une infection par des protozoaires du genre *Babesia* chez 4% des chiens et 24% des tiques parmi lesquelles 13,3% de tiques de l'espèce *Dermacentor reticulatus* étaient infectées par *Babesia canis* et 6,33% des tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* portaient des infections à *Babesia vogeli*. Dans cette enquête, la caractérisation d'espèce n'a pas été effectuée pour les babésies détectées dans le sang des chiens (Beugnet et Marié, 2009). En 2003-2004, l'analyse de 520 tiques retirées sur des chiens (N=377) et sur des chats (N=51) en région Rhône-Alpes et Auvergne a permis de mettre en évidence le pathogène *B. vogeli* dans 4% de tiques du genre *Rhipicephalus* et le pathogène *Babesia canis* dans 6% de tiques du genre *Dermacentor* (Beugnet et Marié, 2009).

Une étude conduite entre décembre 2006 et juillet 2007 a permis de récolter et d'analyser, en France, par PCR (et séquençage le cas échéant) 108 échantillons de sang de chiens suspects de maladies transmises par les tiques de diverses origines géographiques (50% du Sud, 30% du Centre, 17% du Nord et 3% d'Outre-mer). Un seul chien, originaire de l'île de la Réunion, a été confirmé positif à l'infection par des babésies. Le séquençage a confirmé chez cet animal une infection par *B. vogeli* (Criado-Fornelio et al., 2009). Une étude, réalisée entre mars 2006 et mars 2008, a détecté par PCR l'infection par des piroplasmes dans 166 sangs de chiens originaires, pour la plupart, de la moitié Nord de la France (Fritz, 2010). L'analyse par RFLP (utilisant 7 enzymes de restrictions) des produits de PCR a permis de conclure à une infection par *Babesia (canis) canis*, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *Babesia gibsoni* (proche de la souche californienne) chez respectivement 105, 31, 1 et 1 chiens, et à une co-infection par *B. (canis) canis* et *B. (canis) rossi* chez un chien. Des imprécisions quant à la méthode employée et l'absence de dépôt de séquences dans GenBank nuisent aux conclusions de cette étude.

Chapitre 2 : Les tiques *Rhipicephalus sanguineus*

1. Définition et systématique

Les tiques appartiennent au règne Animal et au groupe des Invertébrés. Elles font partie de l'embranchement des *Arthropodes*, de la classe des *Arachnides* et de l'ordre des *Acari*. Leur corps est ainsi recouvert d'un exosquelette qui protège les organes internes et sur lequel s'insèrent les muscles. Elles sont caractérisées par la présence de 4 paires de pattes (à l'exception du stade larvaire), par l'absence d'antenne et la présence de chélicères et pédipalpes (organes intervenant dans la nutrition). Elles se différencient des autres acariens par leur grande taille et leur mode de nutrition (toutes parasites hématophages).

Les tiques d'intérêt médical sont rassemblées dans deux familles : les *Argasidae* et les *Ixodidae* (Estrada-Peña et al., 2004). La famille des *Argasidae*, également connue sous le nom de « tiques molles », rassemble des tiques caractérisées par un rostre infère et l'absence de parties chitinisées aux stades adultes et nymphal. La famille des *Ixodidae*, ou « tiques dures », rassemble des tiques caractérisées par la présence d'un rostre antérieur et terminal et de parties chitinisées (notamment d'un écusson ou bouclier dorsal) à tous les stades. Ce sont des parasites de mammifères principalement, d'oiseaux et de reptiles.

Le genre *Rhipicephalus* (famille des *Ixodidae*) comprend environ 79 espèces dont 5 espèces autrefois rattachées au genre *Boophilus* (Dantas-Torres, 2008). La classification et les principales caractéristiques morphologiques de ce genre sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Classification et principales caractéristiques des tiques du genre *Rhipicephalus*.

Classification		Principales caractéristiques morphologiques du Groupe
Règne	<i>Animal</i>	Organismes composés de cellules eucaryotes hétérotrophes
Embranchement	<i>Arthropodes</i>	Présence d'un exosquelette et d'appendices articulés
Classe	<i>Arachnides</i>	Absence d'antenne et de mandibule; 4 paires de pattes (adultes)
Ordre	<i>Acari</i> = "Acariens et tiques"	Corps non divisé (appelé « idiosome »)
Sous-ordre	<i>Ixodida</i> = "Tiques"	Stigmates le plus souvent situés en arrière des pattes 4; grande taille
Famille	<i>Ixodidae</i> = "Tiques dures"	Présence d'écussons chitinisés
Genre	<i>Rhipicephalus</i>	Brévirostre, metastriata, base du capitulum de forme hexagonal

L'espèce *Rhipicephalus sanguineus* a été décrite pour la première fois en 1806 par Latreille. Le nom d'espèce du latin « *sanguineus* » fait référence au caractère hématophage de ces tiques. La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que, conformément aux autres tiques du genre, *R. sanguineus* serait une espèce d'origine africaine. D'autres évoquent une origine méditerranéenne (Dantas-Torres, 2008; Nava et al., 2012). Malheureusement, selon la littérature, le spécimen type de cette espèce aurait été perdu (Pegram et al., 1987a, 1987b). A

ce jour, il est admis que l'espèce *R. sanguineus sensu stricto* appartient à un complexe composé d'une dizaine d'espèces très proches sur le plan morphologique rassemblées sous l'appellation « complexe *R. sanguineus* », «*R. groupe sanguineus* » ou « *R. sanguineus sensu lato* ». Le statut biosystématique de plusieurs espèces de ce groupe est confus. Les différences interspécifiques sont peu marquées et des différences intra-spécifiques existent. Des erreurs d'identification sont donc possibles (Walker et al., 2000). *Rhipicephalus turanicus* et *Rhipicephalus camicasi* notamment sont morphologiquement très proches de *R. sanguineus* s.s.. Parmi les tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* », seules les espèces *R. sanguineus* s.s. (parasite du chien), *R. turanicus* (parasite des ongulés et des carnivores) et *R. pusillus* (parasite du lapin de Garenne) sont décrites dans le bassin méditerranéen français (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007).

2. Phylogénie

En 1912, Warburton évoquait déjà les difficultés rencontrées pour la classification des espèces du genre *Rhipicephalus* du fait de leur grande uniformité morphologique au sein du genre et de l'existence de variabilités intra-spécifiques (d'après Beati et Keirans, 2001). En 1987, Pegram proposait, à partir de critères morphologiques et de résultats d'essais de croisements, une clarification du « groupe *Rhipicephalus sanguineus* » et confirmait le statut biosystématique confus des espèces au sein de ce groupe (Pegram et al., 1987a, 1987b). C'est à la même époque, grâce à l'essor de la biologie moléculaire, que les premières études sur la phylogénie des tiques ont été conduites (Barker et Murrell, 2002). Elles ont permis de confirmer les corrélations entre les taxons établis jusqu'alors sur des critères morphologiques et les regroupements génétiques observés. Plusieurs marqueurs nucléaires (ADNr 18S, 28S, ITS1, ITS2, gène de la COI) et mitochondriaux (ADNr 12S et 16S) ont par la suite été évalués pour leur niveau de discrimination quant à la phylogénie des différents genres et espèces au sein des tiques dures ou pour les études de génétique des populations. Parmi ces marqueurs, les gènes des ARNr 16S et 12S mitochondriaux se sont avérés particulièrement intéressants pour l'établissement de relations génétiques au sein d'espèces proches ou pour mettre en évidence des phénomènes de spéciations récentes (Beati et Keirans, 2001; Mangold et al., 1998).

En 2005, deux études ont mis en évidence l'existence de deux populations différentes de *R. sanguineus* en Argentine et au Brésil à partir des analyses de données biologiques (reproduction et essais de croisements notamment), morphologiques et génétiques (utilisant le

gène de l'ADNr 12S mitochondrial) (De Oliveira et al., 2005; Szabó et al., 2005). Plus récemment, l'existence de ces deux populations a été confirmée à plusieurs reprises à partir d'analyses phylogénétiques (ADNr 12S et/ou ADNr 16S) d'échantillons de différentes origines géographiques, mettant en outre en évidence une distribution différente des ces deux populations; la première en régions tropicales et sub-tropicales et la deuxième en régions tempérées et méditerranéennes (Burlini et al., 2010; Moraes-Filho et al., 2011; Nava et al., 2012). Les arbres phylogénétiques présentés dans ces études confirment l'existence de deux populations génétiquement distinctes de *R. sanguineus* dans le monde et montrent une assez grande variabilité au sein des séquences de *R. sanguineus* de diverses origines géographiques tout en signifiant la proximité génétique des espèces *R. sanguineus* et *R. turanicus* (Figure 7).

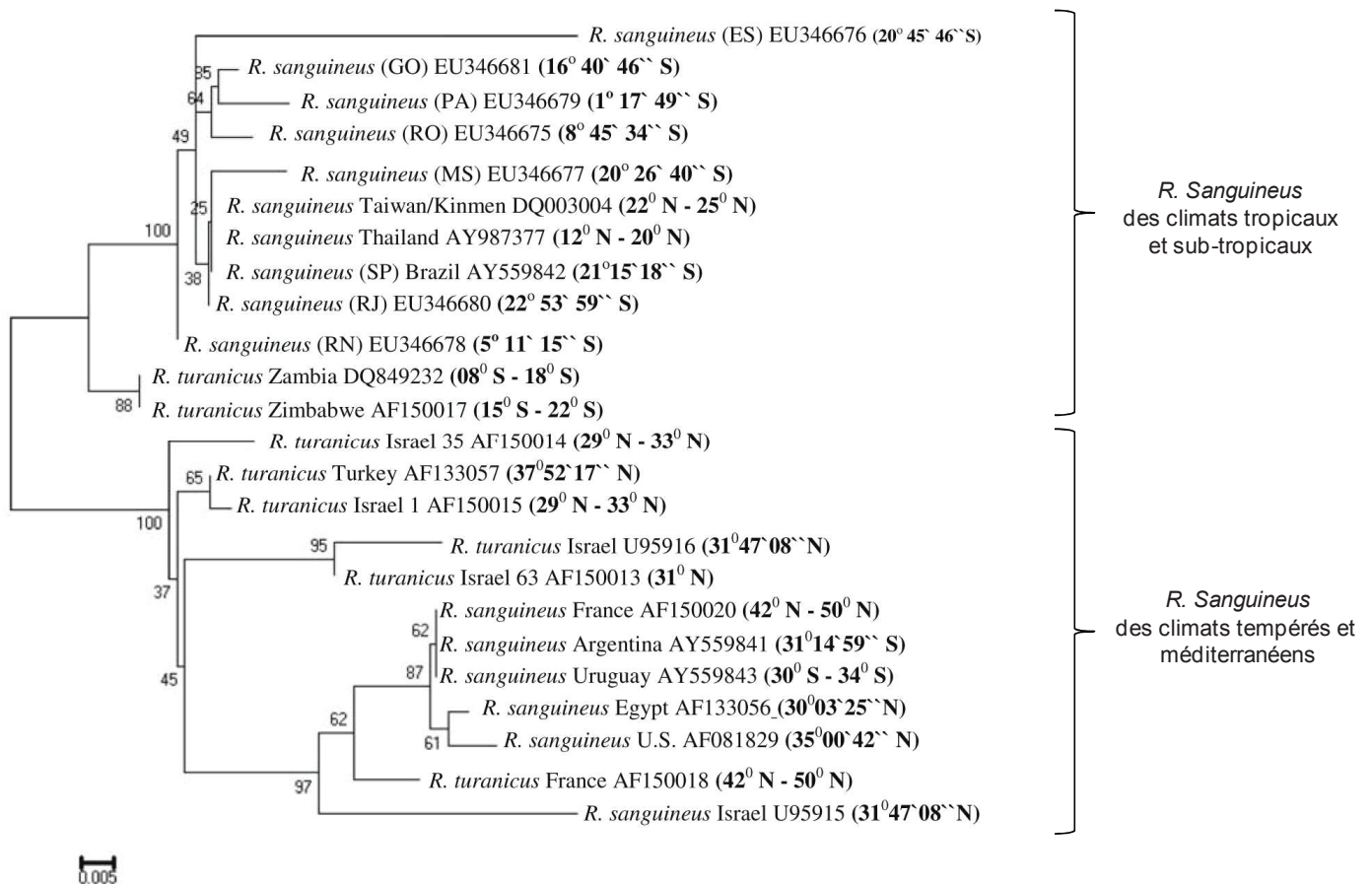


Figure 7 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences de l'ADNr 12S de *R. sanguineus* et *R. turanicus* de diverses origines géographiques (d'après Burlini et al., 2010).

3. Morphologie et anatomie générale

Les caractères morphologiques généraux et l'anatomie externe des tiques dures et de *R. sanguineus* au stade adulte femelle sont présentés sur la Figure 8. Les tiques comportent quatre stades évolutifs : l'œuf, le stade larvaire, le stade nymphal et le stade adulte (mâle ou femelle). Le stade larvaire se caractérise par l'existence de trois paires de pattes (contre quatre aux stades nymphal et adultes). Le stade nymphal est morphologiquement assez proche du stade adulte femelle mais sa taille est plus petite et l'immaturité sexuelle fait qu'aucun pore génital ne peut être observé. Les stades adultes mâle et femelle se caractérisent par la présence de 4 paires de pattes, d'un pore génital, d'un écusson dorsal couvrant la totalité de la face dorsale de l'idiosome chez les mâles et d'un écusson dorsal ne couvrant pas totalement la face dorsale de l'idiosome chez les femelles. Le dernier article (ou « tarse ») de la première paire de pattes porte de chaque côté un petit organe appelé « organe de Haller » dont le rôle sensoriel olfactif est très important dans la quête de l'hôte ou du partenaire au cours des phases de reproduction. Chez les femelles, l'alloscutum est extensible. Elles peuvent ainsi, au cours d'un repas de sang, augmenter jusqu'à environ 100 fois leur poids (Reuben Kaufman, 2010). Les stigmates correspondent aux orifices respiratoires des nymphes et des adultes. Ils sont absents chez les larves qui ont une respiration transcutanée. Chez les tiques dures, les stigmates sont entourés de plaques stigmatiques de formes variables qui sont utilisées dans certains cas pour la caractérisation morphologique des espèces.

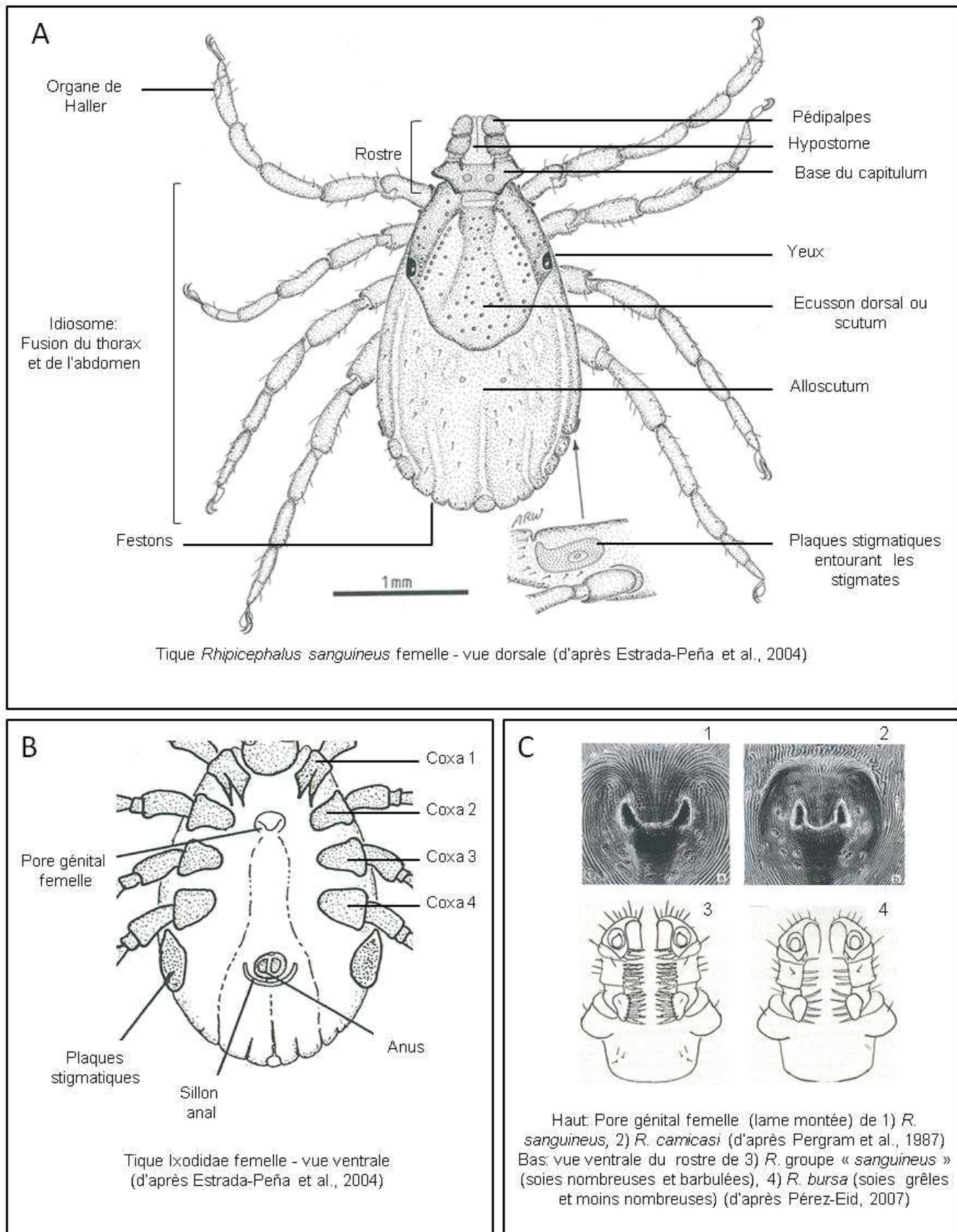


Figure 8: Morphologie externe des tiques *Rhipicephalus sanguineus*. A: vue dorsale, B: vue ventrale et C: détail des pores génitaux et du rostre.

Les principaux critères utilisés pour la diagnose du genre chez les tiques « dures » sont : (i) la forme et la longueur du rostre (tiques longirostres ou brévirostrires), (ii) la disposition relative du sillon anal par rapport à l'anus (permet de différencier les tiques qualifiées de « prostriata », dont le sillon anal passe en avant de l'anus, des tiques « metastriata » dont le sillon anal passe en arrière de l'anus ou n'est pas ou peu visible), (iii) la forme des coxa (présence ou absence d'épines), (iv) la présence ou l'absence d'yeux.

Ainsi, le genre *Rhipicephalus* se caractérise par un rostre court et terminal (tiques qualifiées de brévirostrires), un capitulum dont la base est de forme hexagonale, l'existence d'un sillon anal passant en arrière de l'anus (tiques metastriata), la présence d'yeux et de deux épines sur la coxa 1 (Figures 8A et 8B). Le « groupe *sanguineus* » se distingue des autres espèces du genre *Rhipicephalus* par (i) des soies ventrales, entre les articles des palpes 1 et 2, nombreuses, accolées et plumeuses (Figures 8C₃ et 8C₄) (ii) des adultes de taille supérieure à 2 mm (mâles) ou 3 mm (femelles) (Pérez-Eid, 2007). Au sein du « groupe *sanguineus* », les espèces sont morphologiquement très proches et des variations intra-spécifiques existent. *R. turanicus* et *R. camicasi* par exemple ne diffèrent de *R. sanguineus* s.s. que par des ponctuations plus ou moins marquées sur le scutum des stades adultes et la forme en « U » ou en « V » du pore génital des femelles observé sur lames montées (Figures 8C₁ et 8C₂).

La Figure 9 représente l'organisation interne générale d'une tique femelle. Nous ne présenterons dans le paragraphe qui suit que les caractères anatomiques ayant un intérêt dans la compréhension des mécanismes de transmission de pathogènes.

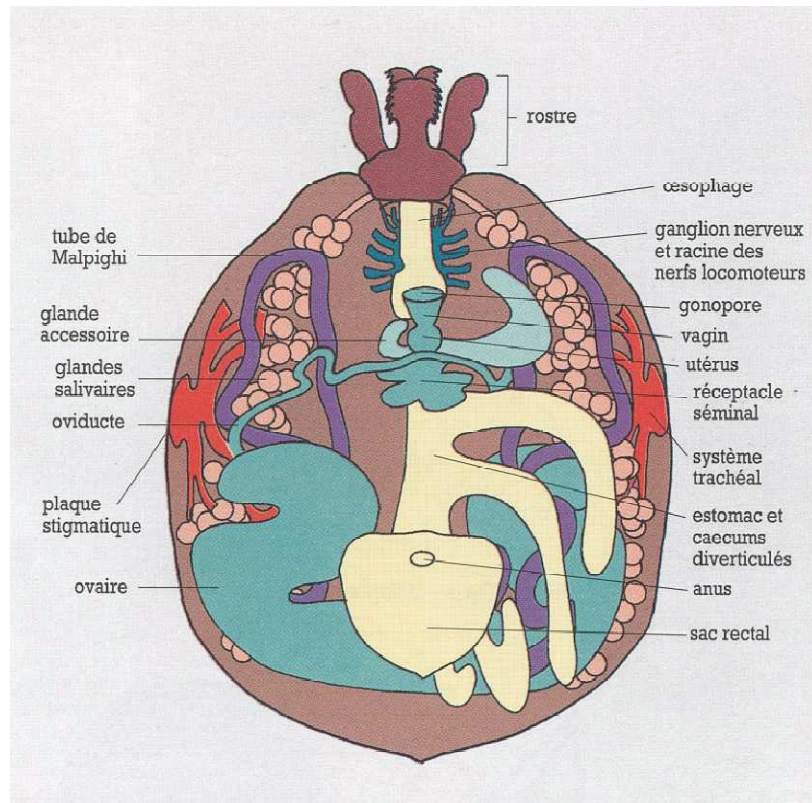


Figure 9 : Représentation schématique des organes internes d'une tique femelle en vue ventrale (d'après Bourdeau, 1993a).

La cavité buccale s'ouvre au niveau du rostre entre l'hypostome et les chélicères. Dans cette cavité buccale débouchent le pharynx (entrée du tube digestif) et les glandes salivaires. Chez les tiques dures, les glandes salivaires sont très développées et formées de nombreux acinis disposés en grappes. Leur taille varie en fonction du statut physiologique de la tique. Elles sont moins développées chez les individus à jeun, plus développées chez les individus gorgés. Ces glandes salivaires jouent un rôle sécrétoire essentiel au déroulement du repas de sang et un rôle dans l'osmorégulation en permettant l'évacuation de l'eau provenant de la concentration du sang absorbé (Pérez-Eid, 2007). C'est dans les glandes salivaires que se produit la dernière étape du cycle de développement des piroplasmes chez les tiques, étape aboutissant à la production de sporozoïtes infectants.

Le tube digestif est très développé. Il est constitué d'un estomac central et de nombreux diverticules (ou caecums) latéraux au niveau desquels se produit la digestion du sang et des fragments tissulaires absorbés. Un court intestin fait suite à l'estomac et aux caecums et se dilate en un sac rectal qui débouche dans le rectum. Le développement

important du tube digestif participe à la digestion des volumineux repas de sangs, notamment chez les femelles fécondées.

L'appareil génital des tiques dures femelles est constitué d'un unique et volumineux ovaire en forme de U disposé en position arrière du corps. L'ovaire se prolonge par deux oviductes qui s'unissent pour former un oviducte commun auquel fait suite de vagin qui aboutit à l'orifice génital. La proximité anatomique du tube digestif et de l'ovaire favorise l'invasion de l'ovaire par les kinètes au cours de la sporogonie et la transmission transovarienne des agents pathogènes.

4. Cycle biologique

4.1. Etapes du cycle

Le cycle biologique de *R. sanguineus* est qualifié de triphasique. Chaque stade actif (larve, nymphe, adulte) ne fait qu'un seul repas de sang et la mue (ou la ponte) qui suit se produit dans l'environnement (Figure 10). Certains auteurs supposent que, lorsque les conditions sont particulièrement favorables (disponibilité d'hôtes notamment), certaines populations de *R. sanguineus* puissent évoluer vers un cycle diphasique, c'est-à-dire que la mue de la larve en nymphe puisse se produire sur l'hôte sans passage dans l'environnement (Uspensky et Ioffe-Uspensky, 2002).

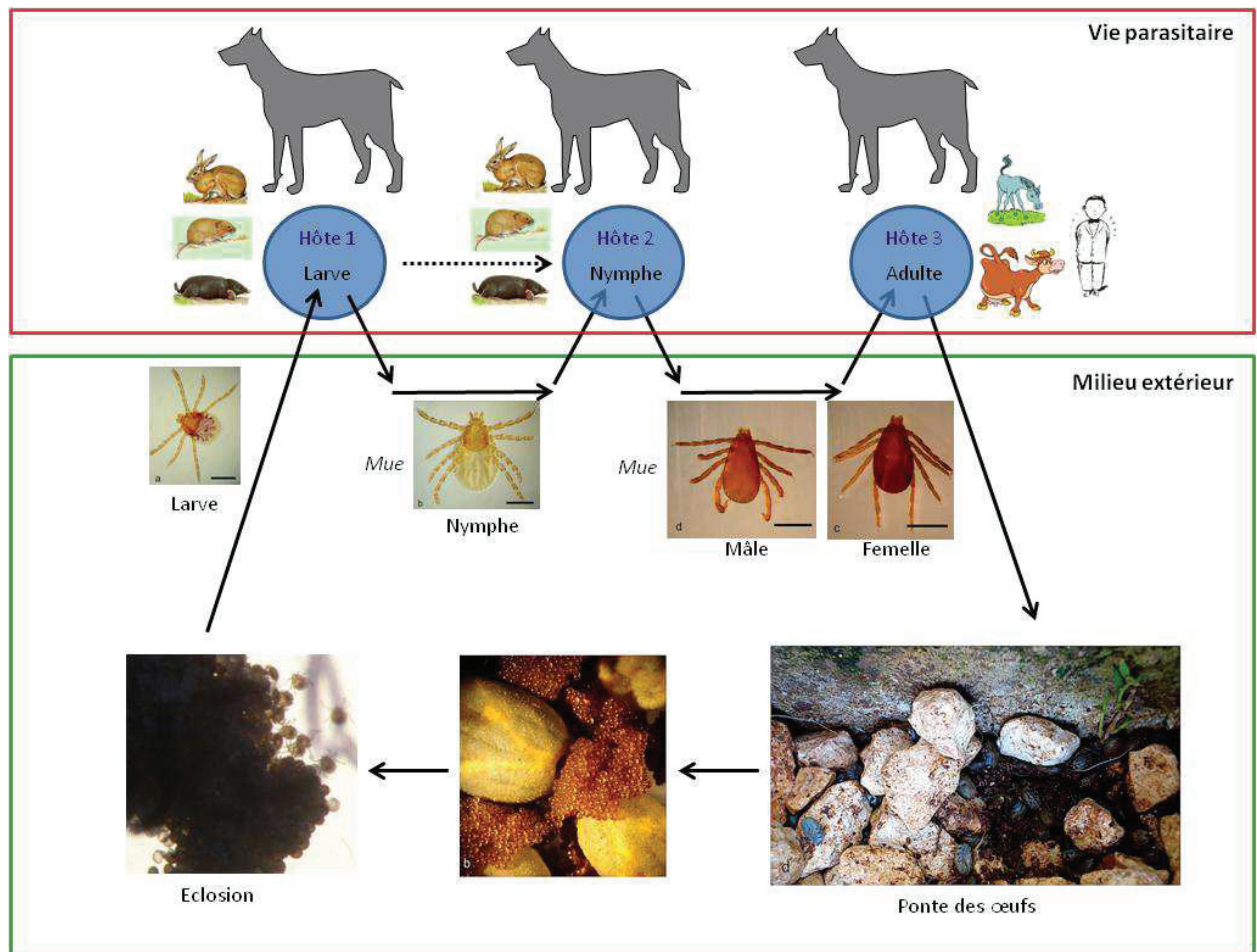


Figure 10 : Cycle de vie des tiques *Rhipicephalus sanguineus* (images VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon et Dantas-Torres et al., 2010).

Le repas de sang des femelles dure de 5 à 21 jours (Dantas-Torres, 2008; Ioffe-Uspensky et al., 1997). Une fois le repas terminé, les femelles se détachent puis tombent sur le sol et se cachent dans l'environnement pour digérer et pondre leurs œufs. Une période de pré-ponte de 3 à 14 jours précède la ponte qui dure de 16 à 25 jours, en moyenne, selon les auteurs et les conditions d'entretien des femelles (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres et al., 2011). Plusieurs milliers d'œufs sont ainsi pondus lorsque la température est optimale (entre 20°C et 30°C) puis la femelle meurt (Dantas-Torres, 2008). L'éclosion des œufs se produit après quelques jours à plusieurs semaines et donne naissance à des larves hexapodes partant immédiatement à la recherche d'un hôte. Le repas de sang des larves dure de 3 à 10 jours (Dantas-Torres, 2008; Ioffe-Uspensky et al., 1997). Au terme du repas, les larves se détachent de l'hôte, tombent au sol et muent en nymphes. Cette mue peut durer de 5 à 17 jours (Dantas-Torres, 2008; Ioffe-Uspensky et al., 1997). Les nymphes partent à leur tour à la recherche d'un hôte, se gorgent pendant 3 à 13 jours (Dantas-Torres, 2008; Ioffe-Uspensky et al., 1997),

se détachent, tombent sur le sol et se transforment en adultes. La mue des nymphes dure de 9 à 47 jours. En Italie, il a été démontré que les larves et les nymphes étaient capables de survivre au jeun dans l'environnement en moyenne 23 jours et 32 jours respectivement en été, alors que les adultes étaient capables de supporter un jeun de 282 jours (385 jours au maximum) (Dantas-Torres et al., 2012b).

Lorsque les conditions sont particulièrement favorables, le cycle de vie peut être complété en 63 à 100 jours (Dantas-Torres, 2008; Uspensky et Ioffe-Uspensky, 2002) et aboutir à la production de 3 à 4 générations par an (Dantas-Torres, 2010; Silveira et al., 2009). La durée de ce cycle est courte si on la compare à celle d'autres espèces de tiques, *Ixodes ricinus* par exemple dont le cycle est complété en moyenne en 2 à 3 ans (Bourdeau, 1993b). Les conditions environnementales, notamment la température et l'hygrométrie, et la présence d'hôtes jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de ce cycle. Ainsi, il a été démontré expérimentalement qu'à 40°C le taux et la rapidité d'attachement des tiques *R. sanguineus* (quel que soit le stade) à un hôte étaient significativement supérieurs à ceux observés à 25°C (Socolovschi et al., 2009). La ponte, l'éclosion, la survie des larves et les mues larvaires et nymphales sont inhibées par les faibles températures (Dantas-Torres, 2010; Dantas-Torres et al., 2010). Une température comprise entre 20 et 35°C et une hygrométrie variant de 35% à 95% sont des conditions favorables à leur développement (Dantas-Torres, 2010).

4.2. Hôtes

Les tiques de l'espèce *R. sanguineus* sont qualifiées de monotropes : elles ont un tropisme privilégié pour une seule espèce hôte. Le chien est l'hôte principal lorsqu'il est présent (Walker et al., 2000). Certaines races de chiens (Cocker spaniel) sont particulièrement sensibles à l'infestation par ces tiques alors que d'autres (Beagle) semblent plus résistantes (Louly et al., 2010).

De manière occasionnelle, des tiques *R. sanguineus* ont été identifiées sur d'autres espèces hôtes telles que des chats, des petits et grands ruminants, des chevaux, des rongeurs, des oiseaux et l'homme (Dantas-Torres, 2010; Walker et al., 2000). Lorsque le cas se présente, les stades immatures (larves et nymphes) sont trouvés sur des rongeurs et autres petits mammifères alors que les adultes parasitent préférentiellement les grands mammifères (Dantas-Torres, 2008). Il est toutefois possible, du fait de la proximité génétique et morphologique des espèces du « groupe *sanguineus* », que les tiques trouvées sur d'autres espèces hôtes que le chien (chat et ongulés notamment) correspondent *in fine* à une autre

espèce que *R. sanguineus* s.s. et notamment à *R. turanicus*, une espèce plus communément retrouvée sur le bétail, les chevaux, les chats et les animaux sauvages (Dantas-Torres, 2010).

5. Ecologie et distribution

Rhipicephalus sanguineus est une espèce à distribution mondiale dont l'extension a été considérablement favorisée par son hôte principal, le chien (Walker et al., 2000). On la trouve principalement entre les latitudes 50°N et 35°S (Walker et al., 2000) dans des régions aux climats chauds et aux hivers doux (Beugnet et al., 2011). *Rhipicephalus sanguineus* est qualifiée d'endophile. Elle vit le plus souvent à proximité directe de son hôte, le chien, d'où l'appellation « tique brune du chien » ou « tique du chenil » qui lui est souvent donnée. Ce caractère endophile la différencie de la majorité des autres espèces de tiques de la famille des *Ixodidae*, qui sont plus souvent exophiles. L'espèce peut ainsi coloniser des zones urbaines ou rurales. On peut la trouver à l'intérieur des habitations, grimpant sur les murs ou les meubles, cachée sous les tapis. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, on peut également la trouver à l'extérieur, grimpant sur les façades des maisons, cachée sur le sol entre des rochers, dans des fissures ou anfractuosités de murs ou encore à l'affût sur les brins d'herbe (cf. Figure 12 du paragraphe 6) (Dantas-Torres, 2010; Uspensky et Ioffe-Uspensky, 2002).

En zone tropicale, ces tiques sont actives tout au long de l'année et peuvent produire 2,5 à 4 générations par an (Cruz-Vazquez et Garcia-Vazquez, 1999; Dantas-Torres, 2010; Silveira et al., 2009). Le taux d'infestation des chiens est maximal au printemps, en été et en automne (Cruz-Vazquez et Garcia-Vazquez, 1999). Une corrélation positive a été observée entre ce taux d'infestation et la pluviométrie au Mexique (Cruz-Vazquez et Garcia-Vazquez, 1999) contrairement au sud du Brésil où la saison sèche s'est avérée être plus favorable à de fortes infestations (Silveira et al., 2009). Des populations dites « sauvages » sont décrites, capables d'infester une plus grande variété d'hôtes (Gilot et Pérez-Eid, 1998). Toutefois, comme évoqué précédemment, la confusion est possible avec d'autres espèces morphologiquement proches.

En Europe et en France, l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* se développe préférentiellement dans le bassin méditerranéen dans les milieux artificialisés tels que les chenils ou les jardins (Gilot et Pérez-Eid, 1998). Transportée par un hôte, elle est capable de s'installer, sous forme de micropopulations plus ou moins transitoires dans des régions situées plus au Nord (Beugnet et Marié, 2009; Gilot et Pérez-Eid, 1998). Elle est active principalement de la fin du printemps au début de l'automne (Gilot et Perez-Eid, 1998;

Dantas-Torres, 2010) et ne semble produire qu'une génération par an (Lorusso et al., 2010). Les adultes assurent la pérennisation de la population pendant l'hiver, les larves et les nymphes sont particulièrement actives au printemps et en été alors que la ponte se produit majoritairement à l'automne et s'interrompt lorsque la température passe en dessous d'un seuil critique de 10°C (Dantas-Torres et al., 2011; Lorusso et al., 2010).

Il n'existe à ce jour aucune carte exhaustive de la distribution des tiques en Europe. Deux cartes font état de distributions probables ou confirmées par des observations ponctuelles. La première est basée sur la construction d'un modèle mathématique et l'application de ce modèle aux conditions climatiques de la France (Estrada-Peña et Bourdeau, 1998). La seconde est basée sur la recherche et l'analyse de tous les articles scientifiques publiés entre 1970 et 2010 rapportant la détection de spécimens de différentes espèces (Estrada-Peña et al., 2012). La distribution probable ou confirmée des trois espèces de tiques de France et d'Europe - *R. sanguineus*, *Ixodes ricinus* et *Dermacentor reticulatus* - à partir de ces deux études est ainsi présentée sur la Figure 11. La distribution des principales espèces de tiques connues dans la zone Paléarctique occidentale est présentée sur la Figure 23 (Annexe 1). Un modèle météorologique, intégrant des données climatiques et biologiques est également mis à la disposition des vétérinaires en Europe par le laboratoire Merial via le site internet www.fleatickrisk.com. Ce modèle permet de suivre et de prédire l'activité et la densité des tiques *R. sanguineus*, *Ixodes ricinus* et *Dermacentor reticulatus* en Europe (Beugnet et al., 2009).

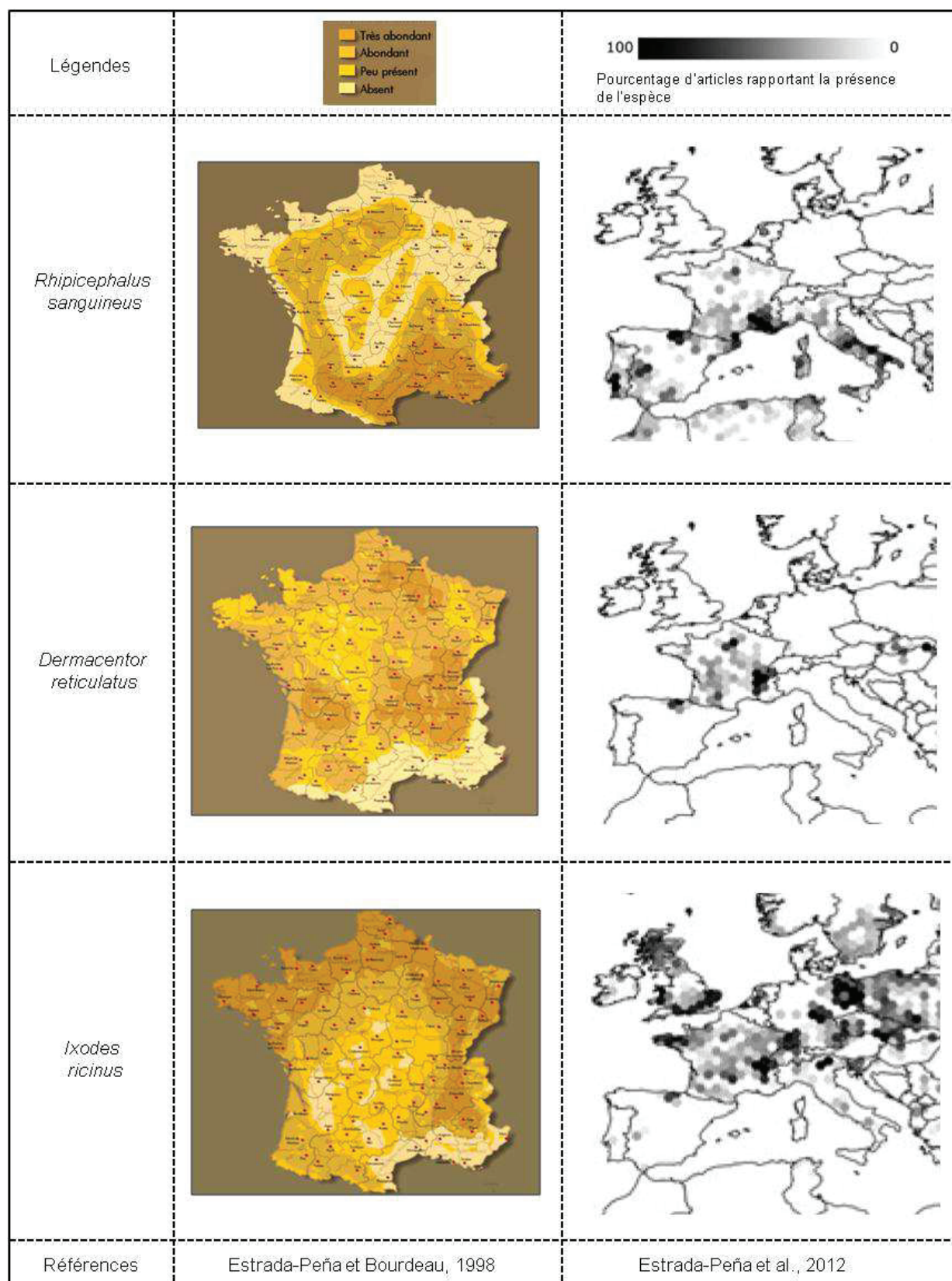


Figure 11 : Répartition géographique des trois principales espèces de tiques de France. A gauche, la distribution supposée à partir d'un modèle mathématique. A droite, la distribution confirmée par une récolte de spécimens.

6. Méthodes d'échantillonnage

Le cycle de vie des tiques *R. sanguineus* se divise en plusieurs étapes dans lesquelles se succèdent des périodes de vie parasitaire et des périodes de vie libre. Les tiques peuvent donc être récoltées soit sur les animaux, soit dans l'environnement. Compte tenu de la spécificité étroite des tiques *R. sanguineus* pour le chien, la méthode de récolte sur l'animal est la plus simple à mettre en œuvre. Toutefois, il est nécessaire de prendre garde, lorsque les tiques sont en cours de gorgement, à les retirer avec précaution afin de préserver le rostre qui est essentiel à la réalisation de l'identification morphologique. Des crochets en forme de « fourchette » (distribués en France sous le nom de crochets O'Tom® ou Tick Twister®) peuvent être utilisés à cet effet.

La méthode la plus souvent décrite pour la récolte de tique dans l'environnement est la méthode dite « du drapeau » (Figure 12). Elle consiste à passer un élément de tissu de 1 m² sur le sol et les végétaux à une vitesse assez lente pour mimer le passage d'un animal et inciter les éventuelles tiques présentes dans l'environnement à s'y fixer. Le drapeau est examiné de manière régulière sur chacune de ses faces en évitant les manœuvres brusques qui pourraient entraîner le décrochement des tiques. Ces dernières sont ensuite récupérées à l'aide d'une pince. Si cette méthode semble efficace pour la récolte des tiques des genres *Dermacentor* et *Ixodes*, elle n'est pas toujours plébiscitée par les équipes travaillant sur les tiques *R. sanguineus* et ne semble pouvoir concurrencer, pour cette espèce, une collecte « à vue » des tiques dans leur environnement, notamment dans les fissures et anfractuosités des murs (Figure 12), sur les tapis des animaux, sur l'herbe ou dans les chenils (Parola et al., 2008).

Enfin, une méthode utilisant des pièges de glace carbonique déposés sur un tissu blanc dans des sites où une présence importante de tiques est suspectée a été utilisée avec succès sur les tiques *R. sanguineus* (Nicholson et al., 2006).



Figure 12 : Récolte des tiques *R. sanguineus*. Haut : récolte « à vue » ; Bas : récolte utilisant la méthode du drapeau (d'après Parola et al., 2008).

7. Lutte

7.1. Lutte chimique

Une connaissance approfondie des cycles de vie des vecteurs est nécessaire pour envisager la mise en place de méthodes de lutte efficaces. La plupart des espèces de tiques *Ixodidae* (tiques dures) passent moins de 10% de leur temps sur leur hôte et plus de 90% de leur temps dans l'environnement (Needham et Teel, 1991). Aussi, pour être efficace, la lutte doit-elle être envisagée selon une stratégie intégrative ciblant à la fois les hôtes et l'environnement.

La lutte contre les tiques dans l'environnement, difficile voire impossible lorsque l'on a affaire à des tiques exophiles est rendue possible, chez *R. sanguineus*, par le caractère le plus souvent endophile de cette espèce. Elle doit être cependant être envisagée avec précaution du fait des répercussions non intentionnelles possibles sur les organismes non cibles (dont l'homme). Son utilisation sur des populations endophiles, confinées, au taux de reproduction élevé, augmente en outre le risque d'apparition de résistances. Il est toutefois difficile de ne pas l'envisager lors d'infestations massives à l'intérieur des maisons qui

exposent les habitants à un risque de transmission d'agents pathogènes. Les recommandations de l'OMS pour une utilisation adéquates des pesticides et des acaricides ont fait l'objet d'un document de synthèse (WHO, 2006). Différentes molécules des familles des carbamates (carbaryl, propoxur), pyréthriinoïdes (α -cyperméthrine, bifenthrine, cyperméthrine, deltaméthrine, λ -cyhalothrine et perméthrine) et organophosphorés (chlorpyrifos-méthyl, diazinon, malathion et pirimiphos-méthyl) peuvent ainsi être employées à l'intérieur des habitations sous réserve du respect de la réglementation en vigueur dans chaque pays. Certaines de ces molécules peuvent également être envisagées pour un usage extérieur (carbaryl, propoxur, deltaméthrine et λ -cyhalothrine). L'utilisation de ces molécules en extérieur est toutefois controversé du fait du caractère souvent inaccessible des tiques dans l'environnement (WHO, 2006).

La prophylaxie ou la lutte chimique par le biais de l'application d'acaricides et/ou produits répulsifs sur les chiens est la principale méthode actuellement recommandée (ESCCAP, 2012, <http://www.esccap.org/>). Cette application doit être accompagnée d'un examen quotidien minutieux des animaux afin de retirer manuellement les tiques fixées ou en recherche d'une zone de fixation. Différentes molécules et formulations ont montré leur efficacité pour le contrôle des Rhipicéphales. Le fipronil, l'amitraz, le carbaryl et les pyréthriinoïdes sous forme de spot-on, colliers, sprays ou poudres sont les plus employées (Dantas-Torres, 2008). Leur utilisation dans les conditions recommandées par les laboratoires producteurs permet une protection la plus souvent satisfaisante. Les applications doivent cependant, dans la plupart des cas, être renouvelées pour assurer une couverture suffisante en cas de fortes infestations (ESCCAP, 2012).

7.2. Lutte biologique

Les modifications « non chimiques » de l'habitat sont essentielles à la mise en place d'une lutte efficace pour le contrôle des tiques de l'espèce *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2008). Le comblement des fissures et des crevasses ainsi qu'un fauchage court et fréquent des zones herbeuses permettent une limitation des refuges possibles pour les tiques en dehors des phases de gorgement (Dantas-Torres, 2008).

Des méthodes de lutte biologique utilisant des « ennemis naturels » des vecteurs (nématodes, champignons, bactéries par exemple) ou des bactéries symbiotiques sont actuellement à l'étude pour la lutte contre les moustiques vecteurs de maladies (Abdul-Ghani et al., 2012). Les études similaires orientées sur la lutte contre les tiques sont plus rares. Une

piste intéressante consiste en l'utilisation de champignons entomopathogéniques, envahissant la tique et produisant des toxines. Certains sont déjà développés et utilisés sur le continent américain pour la lutte contre les coléoptères, hémiptères, lépidoptères et acariens (Fernandes et al., 2012). Il a été démontré que les tiques pouvaient héberger plusieurs genres de bactéries endosymbiotiques (*Rickettsia*, *Coxiella*, *Midichloria*, *Diplorickettsia*, *Wolbachia* ou « *Wolbachia*-like ») (Noda et al., 1997; Plantard et al., 2012). Des bactéries symbiotiques du genre *Wolbachia* ont montré leur capacité à modifier la reproduction des Arthropodes, des moustiques en particulier, selon différents processus (« male killing », féminisation, parthénogénèse et incompatibilité cytoplasmique) (Werren, 2008) et sont désormais considérées comme des candidats prometteurs pour la lutte contre les moustiques vecteurs de maladies (Abdul-Ghani et al., 2012). La présence d'ADN de *Wolbachia* a été confirmée chez les tiques de l'espèce *R. sanguineus* (Foongladda et al., 2011) toutefois l'importance des ces infections est inconnue. D'autre part, les éventuelles répercussions de l'infection des tiques par les bactéries endosymbiotiques restent à démontrer. Ces informations sont nécessaires avant d'envisager chez les tiques une stratégie similaire à celle des moustiques.

7.3. Prophylaxie vaccinale

L'approche vaccinale s'intéresse à l'hôte et aux réactions immunitaires découlant de la morsure et du gorgement de la tique. Le caractère monotrope des tiques *R. sanguineus* permet d'envisager une perspective de prévention vaccinale « anti-tique » (et par là même de protection contre l'ensemble des pathogènes transmis). Cette stratégie a été menée avec succès dans le cas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* chez les bovins (De la Fuente et al., 1998; De Rose et al., 1999). A ce jour, aucun vaccin anti-tique n'est disponible pour une utilisation chez le chien. Des essais de vaccination de lapins contre les tiques *R. sanguineus* utilisant les propriétés immunogènes de la protéine P0 ribosomale ont montré que cette protéine pouvait constituer un candidat intéressant (Rodríguez-Mallon et al., 2012). Les propriétés immunogènes de cette protéine chez le chien restent à démontrer.

Chapitre 3 : Rôle vecteur des tiques *Rhipicephalus sanguineus* *sensu stricto*

1. Notion de vecteur et concepts associés

Au sens strict, un vecteur peut être défini comme « un arthropode capable de **transmettre biologiquement** un pathogène d'un hôte à un autre par piqure » (WHO, 1967). Cette transmission biologique implique que le vecteur soit capable d'assurer la survie, la transformation et parfois la multiplication de l'agent pathogène à l'intérieur de son organisme. Certains auteurs proposent une définition élargie en intégrant dans la notion de vecteur tout « arthropode qui assure la **transmission biologique (ou mécanique) active** d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré » (Rodhain et Pérez-Eid, 1985; Rodhain, 1999). Dans cette définition, "transmission active" signifie que le vecteur, infecté sur un vertébré contaminé, doit pour des raisons biologiques, activement établir le contact entre l'agent infectieux et le vertébré réceptif. Cette définition inclut en outre les vecteurs mécaniques capables de transmettre passivement d'un hôte à un autre un agent pathogène à la suite d'une contamination externe des pièces buccales du vecteur ou d'autres parties exposées de son organisme.

La **compétence vectorielle** caractérise la probabilité qu'a un vecteur de transmettre un pathogène après s'être nourri sur un hôte infecté. Elle dépend de facteurs intrinsèques (génétiques notamment) qui pourront conditionner le pouvoir de réplication et de dissémination du pathogène au sein du vecteur mais peut également être influencée par des facteurs extrinsèques. La compétence vectorielle est un composant essentiel de la **capacité vectorielle** qui traduit le potentiel du vecteur à transmettre l'agent pathogène dans son environnement. La capacité vectorielle dépend donc d'un ensemble de paramètres intervenant dans la transmission d'un agent pathogène dans une région donnée (abondance, longévité, préférence trophique du vecteur...), de la compétence des vecteurs, de la taille de la population, de la fréquence des repas sanguins permettant aux vecteurs de transmettre cet agent. Ainsi, dans un contexte épidémique, différents modèles mathématiques ont été proposés pour définir les facteurs déterminants de la capacité vectorielle, comprendre leurs interactions, et tenter de prévenir l'émergence et la réémergence des maladies (Beerntsen et al., 2000). La capacité vectorielle (V) s'exprime en fonction de la densité de vecteur par personne (m), de la probabilité de piqure journalière d'un hôte (a), de la probabilité de survie journalière du vecteur (p), de la durée en jours de la période d'incubation du pathogène au sein du vecteur (Période d'Incubation Extrinsèque, EIP) notée n , et de la compétence vectorielle (b).

$$V = \frac{ma^2p^nb}{-\ln(p)}$$

Cette équation de base a été proposée par Garrett-jones et collaborateurs, à partir du modèle de Ross-Macdonald (Tran et al., 2005). Mais il existe des variantes incluant des facteurs supplémentaires ayant un impact sur la transmission des maladies vectorielles comme les fluctuations environnementales, notamment de température et de précipitations (Kramer et Ebel, 2003). A partir de la capacité vectorielle, il est possible d'estimer le taux de reproduction de base, noté R_0 , qui représente le nombre d'infections secondaires générées à partir de l'introduction d'un premier cas dans une population d'hôtes sensibles. Si le R_0 est supérieur ou inférieur à 1, on considère que l'infection pourra se propager ou non dans la population considérée (Garrett-jones et Grab, 1964; Kramer et Ebel, 2003).

La **transmission vectorielle** au sens strict d'une infection (telle que définie par l'OMS) nécessite donc l'intervention d'un arthropode hématophage (insecte ou acarien). Elle repose sur des interactions complexes entre agent pathogène, vecteur(s) et hôte(s) au sein d'un écosystème. L'ensemble constitue un **système vectoriel** complexe (Figure 13) dont le fonctionnement dépend de chacun des intervenants (agent pathogène, hôte(s), vecteur(s)), écosystème et facteurs extrinsèques (anthropiques ou climatiques).

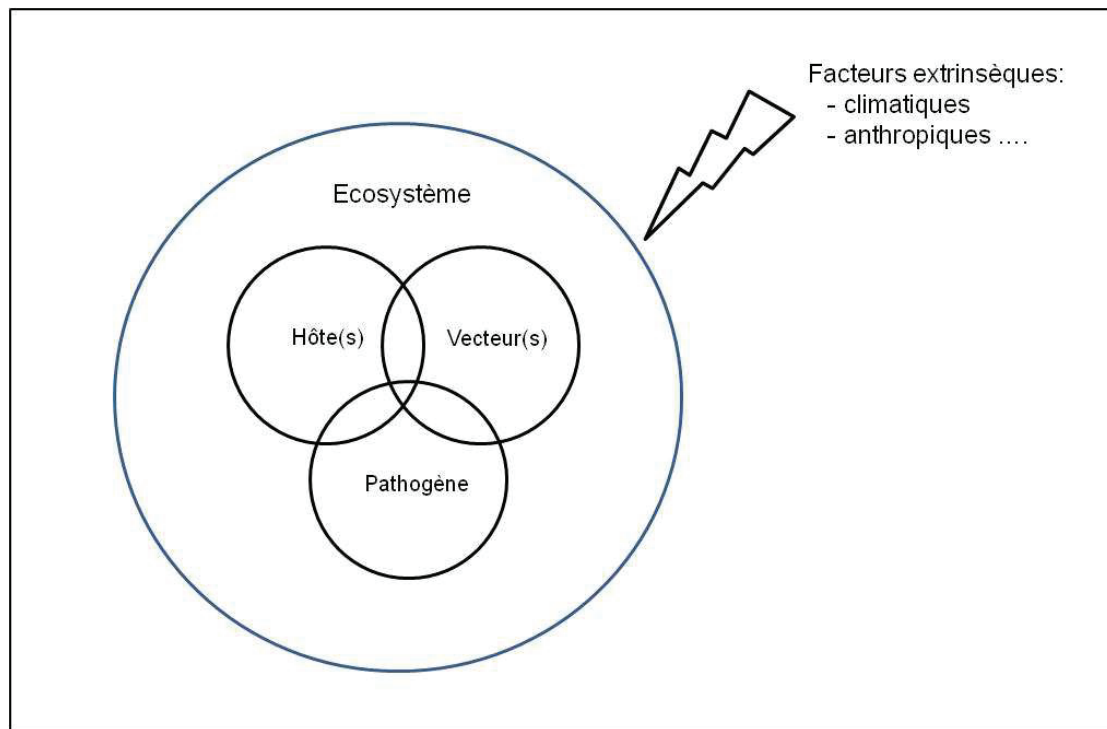


Figure 13 : Représentation schématique d'un système vectoriel.

2. Transmission des agents pathogènes de la tique à l'hôte et inversement

2.1. Transmission des agents pathogènes au cours du repas de sang

2.1.1. Déroulement d'un repas de sang

Les tiques « dures » présentent de nombreuses particularités biologiques favorisant leur rôle vecteur. Parmi ces particularités, le repas de sang, assurant la transmission des agents pathogènes de l'hôte au vecteur et du vecteur à l'hôte, est un élément clé qu'il convient de détailler.

Les tiques dures ne prennent qu'un repas de sang à chaque stade, ce repas est indispensable au passage au stade suivant et à la ponte des femelles. Le repas débute par la recherche d'une zone à peau fine le plus souvent puis, par une action mécanique, la tique enfonce progressivement ses pièces buccales alors que les palpes restent en surface (Figure 14). Rapidement intervient la production d'un ciment, sorte de gaine entourant les chélicères et l'hypostome à partir de sécrétion salivaires fluides qui se solidifient. Ce ciment assure avec l'hypostome (pourvu de dents rétrogrades) une fixation solide de la tique. Son action est essentielle au maintien de la tique jusqu'à la fin de son repas, notamment dans le cas des tiques brévirostriées. Les 24 à 36 premières heures sont consacrées principalement à

l'attachement, l'ingestion de sang est alors limitée (Parola et Raoult, 2001). Le gorgement proprement dit intervient rapidement après la fin de la fixation par alternance de courtes périodes de suctions et de sécrétions salivaires. Une cavité sous-épidermique, appelée « foyer de lyse », dans laquelle la tique va poursuivre son repas de sang est ainsi formée. Les larves, les nymphes et les femelles sont toutes hématophages alors que chez les mâles l'hématophagie est inconstante. Chez les femelles l'importance du repas de sang est conditionnée par l'accouplement puisque seules les femelles fécondées se gorgent complètement. Durant le repas se succèdent en alternance des phases d'absorptions rapides et d'émissions de salive. Chez les femelles, on observe une phase initiale de gorgement lent (3-4 jours) puis une phase de gorgement rapide (un à plusieurs jours) au cours de laquelle elles augmentent considérablement en taille et en poids (Parola et Raoult, 2001). Un fois le repas terminé, le ciment se ramollit, la tique se décroche de l'hôte et tombe sur le sol pour poursuivre son évolution.

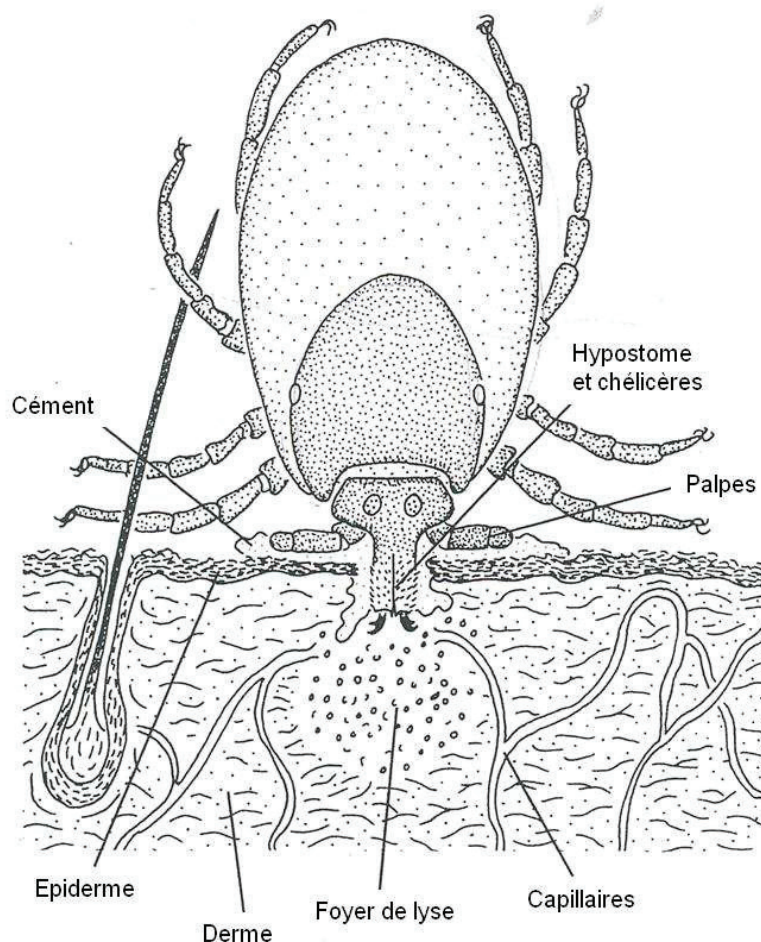


Figure 14 : Repas de sang d'une tique dure femelle sur la peau de son hôte (d'après Estrada-Peña et al., 2004).

2.1.2. Modalités de transmission au cours du repas de sang

L'infection des tiques par des agents pathogènes au cours d'un repas de sang peut se produire selon deux procédés essentiels dont l'importance relative est encore mal connue (Nonaka et al., 2010; Pérez-Eid, 2007). La première modalité consiste en l'infection de la tique au cours d'un gorgement sur un hôte infecté bactériémique, parasitémique ou virémique. En théorie, le risque d'infection de la tique dépend de deux facteurs : le taux de pathogène circulant (en dessous d'un seuil critique, l'infection ne se produit pas) et le temps pendant lequel le pathogène est disponible dans la circulation sanguine. La seconde modalité consiste en l'infection de la tique au cours d'un gorgement sur un hôte non infecté par l'intermédiaire d'un co-repas (« co-feeding ») dans un foyer de lyse déjà utilisé par des tiques infectées. Cette voie de transmission est une voie propre aux tiques (Pérez-Eid, 2007). Si l'importance relative du co-repas, par rapport à l'infection sur un hôte infecté, dans l'infection de nouvelles tiques est mal connue, cette modalité pourrait, dans certaines conditions, s'avérer essentielle et expliquer le maintien de foyers d'infection dans des régions où la prévalence d'infection chez les hôtes est faible ou encore lorsque les phases de circulation des agents pathogènes chez les hôtes sont courtes (Nonaka et al., 2010).

2.1.3. Particularités du repas de sang favorisant la transmission

Les tiques dures présentent de nombreuses caractéristiques favorisant leur rôle vecteur parmi lesquelles la réalisation d'un repas de sang sur plusieurs jours est l'une des principales à considérer (Reuben Kaufman, 2010). Au cours de ce repas de sang, la tique injecte une salive dont la composition est complexe et n'est pas encore totalement élucidée. Cette salive est constituée d'un véritable cocktail chimique et enzymatique composé de ciment, d'enzymes et de substances vasodilatatrices, anti-inflammatoires, antalgiques, anticoagulantes et immunosuppressives (Parola et Raoult, 2001; Reuben Kaufman, 2010). L'association de ces substances est destinée à faciliter la prise du repas sur une longue durée. Les substances vasodilatatrices et anticoagulantes favorisent l'afflux du sang et limitent sa coagulation alors que les substances anti-inflammatoires, antalgiques et immunosuppressives réduisent les défenses douloureuses et immunitaires de l'hôte. Aussi, la morsure de la tique peut-elle ne pas être remarquée ou ne faire l'objet que d'une découverte fortuite et tardive (Parola et Raoult, 2001). L'immunodépression locale favorise en outre la transmission des agents pathogènes à l'hôte mais également l'infection de nouvelles tiques dans le cas d'un co-repas.

2.2. Transmission verticale et transmission trans-stadiale

La transmission verticale correspond à la transmission des agents pathogènes des parents à leur descendance. Chez les tiques, cette transmission verticale des agents pathogènes est possible mais n'est pas systématique (elle dépend principalement de l'agent pathogène). Elle se produit selon deux procédés distincts : (i) une transmission de la mère à sa descendance par le biais de la transmission transovarienne comme cela a été décrit précédemment pour les protozoaires du genre *Babesia* et/ ou (ii) une transmission du mâle à sa descendance par le biais d'une fécondation avec un spermatophore infecté (Pérez-Eid, 2007). La transmission trans-stadiale traduit quant-à-elle la capacité de passage des agents pathogènes d'un stade au suivant. Cette transmission est particulièrement répandue chez les tiques (Pérez-Eid, 2007). Ainsi les nymphes et les adultes sont considérés comme les principaux stades infectants alors que le risque d'infection à partir d'une larve dépend de la capacité qu'à l'agent pathogène à être transmis à la faveur d'une transmission transovarienne.

L'association d'une transmission transovarienne et trans-stadiale peut être considérée comme une adaptation majeure de l'agent pathogène à l'hôte vecteur. Les tiques ne jouent plus alors uniquement le rôle de vecteur vis-à-vis de l'agent pathogène mais assurent également le rôle de réservoir. L'existence possible par ce biais de deux réservoirs (un chez l'hôte vertébré, l'autre chez le vecteur) facilite la persistance à long terme de l'agent pathogène dans l'écosystème et le risque d'apparition de foyers d'infection (Chauvin et al., 2009; Parola et Raoult, 2001).

2.3. Autres modes de transmission

D'autres modes de transmission des agents pathogènes par les tiques sont évoqués, toutefois leur importance semble limitée. Une infection via le dépôt de fèces de tiques contaminées sur la zone de fixation de la tique est décrite pour la bactérie pathogène *Coxiella burnetii* (Parola et Raoult, 2001). Une infection semble également pouvoir se produire lors de projection de fluides infectés de la tique dans les yeux ou sur une peau lésée au moment du retrait de cette dernière (Dantas-Torres, 2008; Parola et Raoult, 2001). Ce mode de transmission est décrit en particulier chez les tiques *R. sanguineus* infectées par les bactéries du genre *Rickettsia*, responsables de fièvres boutonneuses humaines.

2.4. Autres facteurs favorisant la transmission

Une spécificité étroite entre un agent pathogène et son vecteur, associée à une spécificité étroite entre un vecteur et son hôte, peuvent constituer des atouts particulièrement favorables à la réalisation efficace d'une transmission vectorielle dans une population donnée (Chauvin et al., 2009). Le système vectoriel composé du protozoaire *Babesia vogeli*, du vecteur *R. sanguineus* (spécifique du chien) et du chien en est une illustration remarquable. Lorsque cette spécificité étroite est associée à un comportement endophile du vecteur, comme c'est le cas pour la tique *R. sanguineus*, la probabilité d'infection s'en trouve d'autant augmentée. Inversement le caractère exophile et ubiquiste de certaines espèces de tiques (*Ixodes ricinus* par exemple) favorise la circulation des agents pathogènes (*Borrelia burgdorferi* dans le cas de l'exemple évoqué ici) entre différentes espèces hôtes domestiques et sauvages ainsi que la présentation de l'agent pathogène à de nouveaux hôtes potentiels (Chauvin et al., 2009).

3. Agents pathogènes transmis par les tiques *Rhipicephalus sanguineus*

3.1. *Babesia vogeli*

Le rôle vecteur des tiques *Rhipicephalus sanguineus* pour les grandes babésies, autrefois rassemblées sous l'appellation « *Babesia canis* », est connu au depuis le début du 20^{ème} siècle (Dantas-Torres, 2008). L'existence de différences génétiques, antigéniques, géographiques et de vecteurs au sein des grandes babésies a permis de montrer que l'ancienne appellation « *Babesia canis* » regroupait au moins trois espèces distinctes désormais communément appelées *Babesia canis*, *Babesia vogeli* et *Babesia rossi*, respectivement transmises par *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* et *Haemaphysalis laevis* (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011; Uilenberg, 2006; Zahler et al., 1998).

Des infections de chiens par *Babesia vogeli* sont décrites dans de nombreuses régions du monde avec une distribution qui correspond le plus souvent à celle du vecteur *R. sanguineus* (Solano-Gallego et Baneth, 2011). *B. vogeli* a notamment été détectée à plusieurs reprises dans des pays du bassin méditerranéen dont l'Italie, l'Espagne, le Portugal, l'Albanie, la Slovaquie, la Croatie, la Turquie, la Tunisie et l'Egypte (Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; Criado-Fornelio et al., 2007; Duh et al., 2004; Gülanber et al., 2006; Hamel et al., 2009; M'ghirbi et Bouattour, 2008; Solano-Gallego et al., 2008; Uilenberg et al., 1989). En France, au 1er janvier 2010, *B. vogeli* n'avait été mise en évidence qu'une seule fois chez un chien d'origine italienne qui aurait acquis le parasite dans la région de Nantes (Cacciò et al., 2002).

De l'ADN de ce pathogène avait également été détecté dans des tiques *R. sanguineus* récoltées dans le Sud de la France lors d'une précédente enquête (Beugnet et Marié, 2009).

3.2. *Ehrlichia canis*

Les bactéries du genre *Ehrlichia* appartiennent à la famille des *Anaplasmataceae* et à l'ordre des *Rickettsiales*. Toutes les bactéries de ce genre sont transmises par des tiques de la famille des *Ixodidae* (Bremer et al., 2005). L'ehrlichiose canine à *Ehrlichia canis* est une maladie bactérienne à localisation intra-monocytaire décrite pour la première fois en 1935 (Little, 2010). C'est une zoonose occasionnelle, souvent grave et pouvant conduire à la mort (Day, 2011; Little, 2010). Sur le plan clinique, l'infection d'un chien par *Ehrlichia canis* peut se traduire par une grande variété de symptômes, souvent peu spécifiques, parmi lesquels les plus fréquemment rencontrés sont de la fièvre, de la léthargie, de l'anorexie, des myalgies, de la splénomégalie, une lymphadénopathie et des troubles de l'hémostase (Little, 2010). L'âge, le statut immunitaire et la présence de co-infections influencent la gravité des répercussions cliniques.

La compétence vectorielle des tiques de l'espèce *R. sanguineus* vis-à-vis de ce pathogène a été démontrée en 1975 (Groves et al., 1975). Les chiens font office de réservoir pour cette bactérie. Les stades immatures de *R. sanguineus* s'infectent en se gorgeant sur un chien infecté et maintiennent l'infection d'un stade à l'autre par transmission trans-stadiale (Groves et al., 1975; Little, 2010) alors que la transmission transovarienne n'a pas pu être démontrée (Groves et al., 1975). Des essais avancent en outre l'existence possible d'une transmission intrastadiale (entre stades adultes) faisant intervenir les tiques *R. sanguineus* mâles capables d'interrompre leur repas sur un hôte pour le reprendre sur un autre (Bremer et al., 2005; Little et al., 2007). L'importance de ce mode de transmission est encore peu connue (Little, 2010).

3.3. Rickettsies agents de fièvres boutonneuses

Les Rickettsies agent de fièvres boutonneuses humaines (également appelées Rickettsies SFG pour « Spotted fever Group ») sont des bactéries à localisation intracellulaire obligatoire qui appartiennent à la famille des *Rickettsiaceae* et à l'ordre des *Rickettsiales*. Ces bactéries sont transmises par des tiques. C'est au début du 20^{ème} siècle que furent identifiés les premiers cas de fièvre boutonneuse sur le continent américain et dans le bassin méditerranéen dont les agents responsables sont respectivement *Rickettsia rickettsii*,

l'agent de la fièvre boutonneuse des montagnes rocheuses et *Rickettsia conorii*, l'agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne (Parola et Raoult, 2001). Avec le développement de la biologie moléculaire de nouvelles espèces ont été par la suite découvertes avec une distribution désormais mondiale, toutes espèces confondues (Parola et Raoult, 2001).

En dépit de leur caractère peu anthropophile, les tiques de l'espèce *R. sanguineus* jouent le rôle de vecteur de *Rickettsia conorii*, l'agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, pour l'homme (Dantas-Torres, 2008; Parola et Raoult, 2001; Socolovschi et al., 2012). Après une incubation de 6 à 10 jours, l'infection humaine se traduit par une atteinte brutale associant fièvre, frissons, myalgies, éruption maculo-papuleuse, adénopathie régionale et un escarre caractéristique au site d'inoculation (Parola et Raoult, 2001). Les températures élevées (fortes chaleurs) semblent corrélées à une risque accru de transmission de la maladie à l'homme (Socolovschi et al., 2009). La compétence vectorielle des tiques de l'espèce *R. sanguineus* pour cette bactérie a été démontrée en 1932 (Parola et al., 2009). La bactérie est transmise d'une génération de vecteur à l'autre par transmission transovarienne et trans-stadiale. Il a toutefois été démontré expérimentalement que l'infection des tiques par cette bactérie pouvait avoir des répercussions délétères sur la reproduction et la survie des vecteurs (Socolovschi et al., 2012). Aussi la prévalence dans la nature des tiques infectées est-elle souvent faible (inférieure à 1%) avec toutefois la possibilité d'observer des prévalences plus élevées dans de petits foyers (Socolovschi et al., 2012). L'existence probable d'un réservoir vertébré est souvent évoquée sans avoir jamais été confirmée (Socolovschi et al., 2012).

Le rôle probable du chien dans l'entretien de l'infection dans la nature a été mentionné à plusieurs reprises du fait de la grande affinité de *R. sanguineus* pour cette espèce. Des séroprévalences élevées vis-à-vis de *Rickettsia* sp. ont pu être mises en évidence chez des chiens en zones d'endémie de fièvre boutonneuse méditerranéenne et le portage asymptomatique (ou peu symptomatique) de chiens par cette bactérie a été démontré (Parola et al., 2009). Quelques cas d'atteintes cliniques de chiens (syndrome fébrile) ont été documentés (Solano-Gallego et al., 2006).

Le rôle possible de *R. sanguineus* dans la transmission d'autres espèces de Rickettsies du groupe boutonneux a été évoqué mais reste à confirmer (Dantas-Torres, 2008). De très fortes infestations par des tiques de cette espèce, dans des habitations dans lesquelles des cas humains de fièvres boutonneuses dues à *Rickettsia rickettsii* ont été à plusieurs reprises constatées (Demma et al., 2006; Nicholson et al., 2006) et soutiennent le rôle vecteur potentiel de cette tique pour la bactérie. Une transmission transovarienne et trans-stadiale de *Rickettsia rickettsii* chez les tiques *R. sanguineus* a également été démontrée (Parker et al., 1933).

3.4. *Hepatozoon canis*

Le genre *Hepatozoon* rassemble des protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* et à la famille des *Hepatozoidae*. Les espèces de ce genre sont génétiquement proches des piroplasmes. *Hepatozoon canis* est une espèce fréquente en Afrique, en Asie, dans le Sud de l'Europe (bassin méditerranéen notamment) et en Amérique du Sud (Baneth, 2011). Le cycle de développement de ce parasite fait intervenir, comme dans le cas des piroplasmes, une reproduction sexuée chez un hôte définitif invertébré (*R. sanguineus* dans le cas d'*Hepatozoon canis*) et une multiplication asexuée chez le chien hôte intermédiaire. Chez le chien, les stades gamontes circulent dans les leucocytes et peuvent être mis en évidence par observation microscopique d'un étalement de sang coloré (Figure 15). Les répercussions cliniques de l'infection chez le chien sont variables, le plus souvent sub-cliniques, elles peuvent occasionnellement se manifester par des atteintes modérées à sévères avec un tableau clinique dominé par une importante léthargie, de la cachexie et de l'anémie. A la différence de la grande majorité des autres agents pathogènes (bactéries ou protozoaires) transmis par les tiques, la transmission d'*Hepatozoon canis* de la tique au chien ne se produit pas par morsure au cours d'un repas de sang mais par ingestion de la tique (Nordgren et Craig, 1984). Les sporozoïtes ingérés passent alors au travers de la barrière intestinale et envahissent les cellules mononuclées pour être disséminés vers les organes cibles via le sang et la lymphe (Baneth, 2011). La transmission par la salive de tique de ce protozoaire n'a jamais été démontrée (Baneth, 2011). Une transmission verticale (de la mère au chiot) est également possible alors qu'une infection par carnivorisme a été suggérée sans avoir jamais été démontrée (Baneth, 2011). L'infection de carnivores sauvages est également possible, toutefois l'importance de l'infection chez ces espèces et leur implication dans l'entretien de la maladie dans la nature reste inconnue (Baneth, 2011).

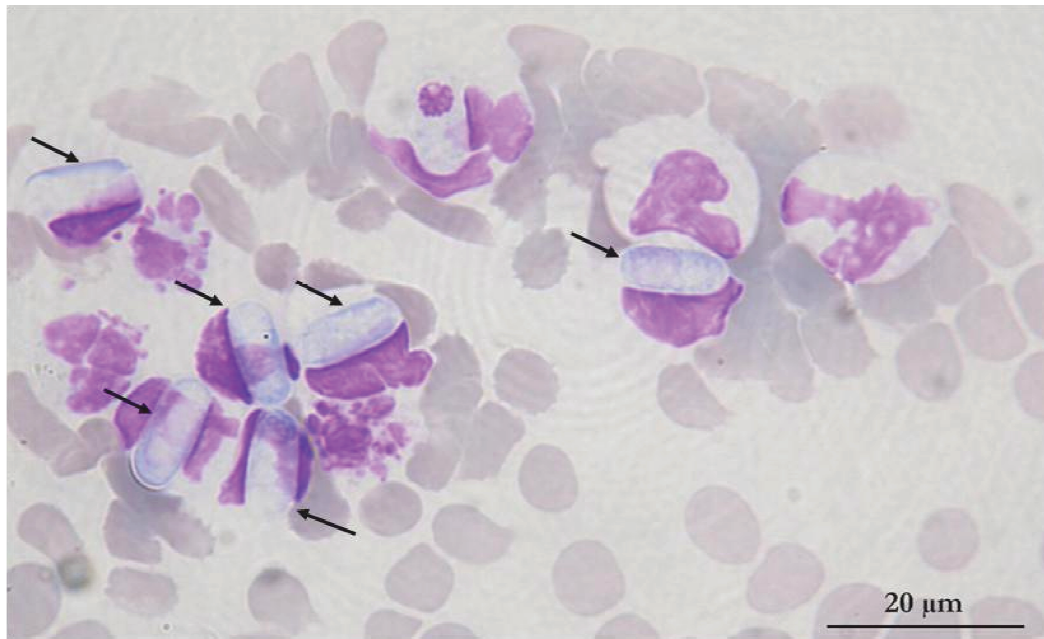


Figure 15 : *Hepatozoon canis* au microscope optique (indiqués par les flèches) après coloration May-Grünwald-Giemsa d'un étalement de sang de chien infecté (VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon).

3.5. Autres espèces potentiellement transmises

R. sanguineus est le vecteur suspecté d'un certain nombre d'autres agents pathogènes pour lesquels l'importance de la transmission et la compétence vectorielle n'ont pas toujours été clairement établies. La liste de ces agents pathogènes et leurs principales caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Autres agents pathogènes transmis ou potentiellement transmis par *R. sanguineus* (classés par ordre alphabétiques).

Agent pathogène	Maladie associée	Remarques	Références
<i>Anaplasma platys</i>	Anaplasmose canine (Thrombocytopénie cyclique canine ; "Ehrlichiose" Thrombocytaire)	De l'ADN d' <i>A. platys</i> a été détecté à plusieurs reprises dans des tiques <i>R. sanguineus</i> et la mise en évidence, chez des chiens, de co-infections avec <i>Ehrlichia canis</i> et <i>Babesia vogeli</i> , deux agents pathogènes qui partagent le même vecteur, suggèrent le rôle de <i>R. sanguineus</i> dans sa transmission. L'infection n'a cependant pas pu être reproduite au cours d'un essai visant à évaluer la compétence vectorielle de <i>R. sanguineus</i> pour ce pathogène.	(Dyachenko et al., 2012; Simpson et al., 1991)
<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmose bovine	La compétence vectorielle des tiques " <i>R. sanguineus</i> " pour cette bactérie a été démontrée chez des veaux. La spécificité normalement étroite des tiques <i>R. sanguineus</i> s.s. pour le chien laisse penser que l'infection expérimentale a pu être réalisée avec une autre espèce de tique, morphologiquement proche (<i>R. turanicus</i> notamment).	(Parker et Wilson, 1979)
<i>Babesia caballi</i> <i>Theileria equi</i>	Piroplasmoses équine	La compétence vectorielle des tiques " <i>R. sanguineus</i> " pour ces protozoaires est suspectée. L'importance de ces tiques dans la transmission et l'entretien de la maladie est inconnue mais probablement limitée du fait de la spécificité étroite connue des tiques <i>R. sanguineus</i> pour le chien.	(Dantas-Torres, 2008)
<i>Babesia canis</i>	Babésiose canine (grande babésie)	De l'ADN de <i>B. canis</i> a été détecté dans des tiques <i>R. sanguineus</i> en Italie et une transmission verticale a été démontrée chez les tiques de cette espèce. La compétence vectorielle de <i>R. sanguineus</i> vis-à-vis de <i>B. canis</i> reste à démontrer.	(Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010)
<i>Babesia gibsoni</i>	Babésiose canine (petite babésie)	La distribution semblable de <i>B. gibsoni</i> et de <i>R. sanguineus</i> laisse supposer que cette tique pourrait être un vecteur de la maladie. Aucune preuve fiable de cette transmission n'est disponible actuellement.	(Irwin, 2010)
<i>Cercopithifilaria grassii</i> (= <i>Dipetalonema grassii</i>) <i>Dipetalonema dracunculoides</i>	Filariose canine	Des larves infestantes de ces 2 espèces de filaires ont été mises en évidence chez des tiques <i>R. sanguineus</i> . La transmission expérimentale de <i>Dipetalonema dracunculoides</i> par <i>R. sanguineus</i> a été confirmée en 1993. L'importance de la tique dans l'entretien du cycle parasitaire de ces helminthes est inconnue.	(Bain, 1972; Bain et al., 1982; Olmeda-García et al., 1993)
<i>Coxiella burnettii</i>	Fièvre Q (Mammifères dont homme)	Les infections d'hôtes réceptifs par cette bactérie se produisent le plus souvent par ingestion ou inhalation d'organismes virulents présents dans des mammifères infectés. Le rôle des tiques est probablement minime dans la transmission de la bactérie. Toutefois des concentrations importantes d'éléments virulents ont été retrouvées dans les fèces de tiques infectées.	(Dantas-Torres, 2008; Parola et Raoult, 2001)
<i>Leishmania infantum</i>	Leishmaniose canine (zoonose)	Le vecteur de la leishmaniose canine est le phlébotome. Le rôle possible des tiques <i>R. sanguineus</i> dans la transmission de ce protozoaire a été évoqué. Un essai d'évaluation expérimental de la compétence vectorielle des tiques <i>R. sanguineus</i> n'a pas abouti à une transmission des leishmanies à des chiens exposés.	(Dantas-Torres, 2011; Paz et al., 2010)
<i>Mycoplasma haemocanis</i> (anciennement <i>Haemobartonella canis</i>)	Mycoplasmose canine (Hémobartonellose)	La compétence vectorielle des tiques <i>R. sanguineus</i> pour cette bactérie a été démontrée chez des chiens splénectomisés. Il existe une transmission transovarienne et trans-stadiale chez le vecteur. Toutefois, l'importance relative de la transmission de cette bactérie par les tiques par rapport aux autres modes d'infection connus (ingestion de sang infecté, transfusion), reste à évaluer.	(Messick, 2003; Seneviratna et al., 1973)
<i>Rangellia vitalli</i>	Nambiuu (chien)	<i>Rangellia vitalli</i> est un protozoaire <i>Apicomplexa</i> , non encore complètement caractérisé, identifié chez des chiens au Brésil. Le rôle des tiques <i>R. sanguineus</i> dans la transmission de ce protozoaire est suspecté mais non confirmé.	(Loretti et Barros, 2005)

PROBLEMATIQUE ET MODELE D'ETUDE

Les arthropodes vecteurs (tiques et moustiques notamment) représentent donc, par l'intermédiaire des agents pathogènes qu'ils sont susceptibles de transmettre, une menace non négligeable pour la santé humaine et animale. En Europe, les tiques, majoritairement représentées par les tiques «dures» (famille des *Ixodidae*) sont les premiers vecteurs de maladies toutes espèces confondues et une extension de leur aire de distribution a été évoquée au cours des dernières décennies. Chaque année, plus de 50 000 cas de maladie de Lyme sont diagnostiqués chez l'homme en Europe et le nombre de cas d'encéphalites à tiques est en constante augmentation (Randolph, 2010). Des phénomènes similaires sont constatés chez les espèces animales chez lesquelles des maladies telles que babésioses, anaplasmoses, ehrlichioses et leishmanioses sont en progression régulière (Beugnet et Marié, 2009). Parmi des tiques dures, l'espèce *R. sanguineus*, probablement l'espèce la plus répandue sur la planète, se distingue par son caractère endophile et sa spécificité étroite pour le chien. Elle intervient dans la transmission de protozoaires (*Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*) et de bactéries pathogènes (*Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*) à l'homme et au chien. Par le biais de ce dernier, des populations de tiques infectées sont susceptibles de se développer à proximité ou à l'intérieur même des habitations.

Au début de ces travaux de thèse, les connaissances sur la distribution des tiques en France étaient parcellaires. En particulier, les connaissances sur la répartition des deux vecteurs probables de babésiose canine en France, *R. sanguineus* et *Dermacentor reticulatus* laissaient supposer une présence soutenue du premier et une absence du second sur l'ensemble du pourtour méditerranéen français (Figure 11, page 53). En parallèle, des cas de babésioses canines étaient fréquemment rapportés dans l'Ouest du bassin méditerranéen français alors que dans l'Est et en Corse, cette maladie n'était que rarement décrite (Figure 6, page 38). La caractérisation moléculaire des agents pathogènes responsables des cas de babésiose canine mentionnés dans le Sud de la France n'avait été que rarement réalisée et le rôle vecteur de *R. sanguineus* dans la transmission de la maladie restait à démontrer. Aussi, plusieurs hypothèses ont-elles été avancées afin de tenter de répondre aux questions soulevées. Notamment, pour expliquer les prévalences plus élevées de babésiose canine rapportées dans l'Ouest du bassin méditerranéen alors que la présence du vecteur *R. sanguineus* est évoquée sur l'ensemble de ce territoire (et le vecteur *D. reticulatus* apparemment absent) plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Les trois principales sont : (i) une modification de la distribution des vecteurs par rapport aux cartes préalablement établies, (ii) l'existence de populations différentes au sein de l'espèce *R. sanguineus* pouvant présenter des compétences vectorielles différentes vis-à-vis des agents de babésiose canine

et/ou (iii) l'existence de co-infections chez les tiques *R. sanguineus* capables de moduler la compétence vectorielle des tiques *R. sanguineus* vis-à-vis des agents de babésiose canine en fonction des régions.

Les travaux de thèse ont ainsi été initiés pour répondre à quatre objectifs principaux : (1) apporter de nouveaux éléments épidémiologiques sur la babésiose canine en France et plus particulièrement dans le Sud du pays, (2) évaluer le rôle vecteur potentiel des tiques *Rhipicephalus sanguineus* vis-à-vis des agents de babésioses (piroplasmoses) canines, (3) améliorer les connaissances sur la génétique des tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* » et de tester l'hypothèse de l'existence de sous-espèces ou de populations différentes, et (4) évaluer la prévalence de l'infection de chiens et des tiques *R. sanguineus* par des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* (notamment *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys*) dans la région étudiée.

Afin de répondre à ces objectifs, il nous a paru opportun de définir, dès le début de ce travail, le pathosystème vectoriel de notre étude et les interactions possible entre chacun des intervenants du système (Figure 16). Ce pathosystème vectoriel est composé d'agents pathogènes (des protozoaires appartenant aux genres *Babesia* et *Theileria*), des vecteurs (des tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*), et d'hôtes (le chien principalement, des hôtes sauvages et l'homme occasionnellement).

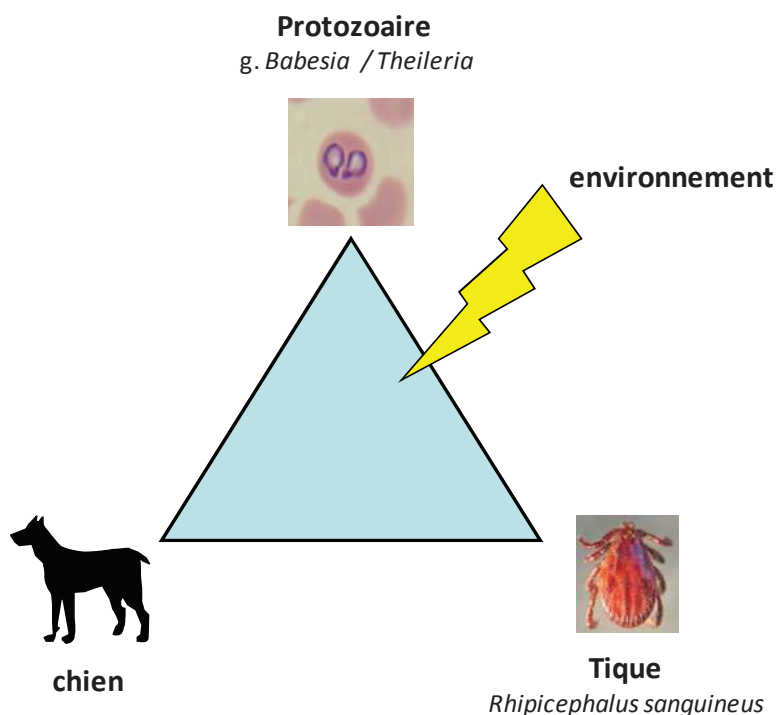


Figure 16 : Présentation du pathosystème vectoriel de l'étude.

Les trois composants essentiels du pathosystème interagissent dans un environnement qui est complexe et variable dans l'espace et le temps. Ainsi, mieux comprendre la dynamique de transmission de ce système vectoriel peu connu en France, nécessite de délimiter un territoire compatible avec les objectifs de notre étude. Nous avons pour cela, dans un premier temps, exploité les données d'une enquête épidémiologique menée en 2006-2007 en France métropolitaine. Les résultats de cette enquête et les critères du choix des zones d'étude sont présentés dans le premier chapitre du mémoire expérimental. A ce chapitre introductif font suite trois autres chapitres traitant de la dynamique du portage des pathogènes par les tiques et les hôtes et de l'étude de la génétique des tiques *R. sanguineus* récoltées dans le bassin méditerranéen français. Une discussion générale de l'ensemble de nos résultats termine cette partie de ce travail.

MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL

Chapitre 1 : Enquête épidémiologique multirégionale sur la babésiose canine en France et choix de sites pour l'étude de la dynamique de transmission

Pour répondre aux objectifs que nous nous étions fixés et face aux informations parcellaires dont nous disposions, nous avons choisi d'aborder ce travail expérimental selon deux axes. Le premier axe a consisté à exploiter toutes les informations disponibles sur l'épidémiologie de la babésiose canine en France par le biais (i) d'une revue bibliographique exhaustive des études engagées sur ce territoire, dont les principales ont été résumées dans la partie bibliographique de ce travail, et (ii) de l'analyse et l'exploitation des résultats d'une enquête longitudinale prospective sur la babésiose canine réalisée en 2006-2007 par des membres de notre équipe d'accueil dans 41 départements français, enquête dans laquelle 836 cas de babésioses canines ont été rapportés et l'espèce de piroplasma caractérisée dans 25 sangs de chiens infectés. Les résultats de cette étude nous ont permis de faire le point sur les méthodes disponibles pour la détection et l'identification des agents de piroplasmose et de conforter nos certitudes quant à l'intérêt de l'étude des agents et des vecteurs impliqués dans la transmission de la maladie dans le Sud de la France. Le second axe, initié simultanément, visait, quant à lui, à identifier des sites d'intérêt pour l'étude du pathosystème « Chien - *Rhipicephalus sanguineus* - piroplasmes » caractérisés notamment par une présence majoritaire et soutenue du vecteur *R. sanguineus* sur les chiens. En effet, les seules informations que nous possédions au début de ce travail faisaient état (i) de la présence soutenue des tiques *R. sanguineus* dans le bassin méditerranéen français (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007), (ii) de l'existence possible de micropopulations transitoires en dehors de ce territoire (Beugnet et Marié, 2009; Gilot et Pérez-Eid, 1998), et (iii) de sa capacité à proliférer, de manière parfois considérable, aux alentours des chenils, des maisons ou dans les jardins de propriétaires de chiens (Parola et al., 2008) sans que les limites de la distribution de l'espèce ne soient clairement définies.

1. Analyse des résultats d'une enquête épidémiologique multirégionale sur la babésiose canine conduite en 2006-2007 en France

1.1. Introduction

D'octobre 2006 à décembre 2007, une enquête prospective longitudinale sur la babésiose canine a été entreprise auprès de 41 vétérinaires dans 41 départements français à la demande du laboratoire MSD Santé Animale (Booxmeer, Pays-Bas ; anciennement Intervet) par des membres de la « Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés » (VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon, France). Un questionnaire à choix multiple a été proposé aux vétérinaires afin de collecter, pour chaque cas suspect ou confirmé par observation microscopique des parasites, des informations sur l'épidémiologie et les répercussions cliniques de l'infection. Des informations concernant 836 cas de babésioses canines ont ainsi été obtenues et 70 échantillons de sang de chiens ont fait l'objet d'une analyse PCR-RFLP afin de confirmer une infection et/ou de caractériser l'agent pathogène responsable. L'analyse et l'interprétation des données de cette étude m'ont été confiées dans le cadre de mes travaux de thèse. Les résultats de ces analyses sont présentés sous forme de publication (Publication n°1, resoumise après révision à la revue Veterinary Parasitology).

1.2. Publication n°1: “Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: results of a multiregional study”

Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: results of a multiregional study

M. René-Martellet^{a*}, J. Chêne^a, L. Chabanne^a, K. Chalvet-Monfray^b, G. Bourdoiseau^a

^a Université de Lyon, VetAgro Sup, Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés, F-69280, Marcy l'Etoile, France

^b Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité d'Epidémiologie Animale INRA UR 346, F-69280, Marcy l'Etoile, France

* Corresponding author. Tel: +33 4 78 87 25 74.

E-mail address: magalie.renemartellet@vetagro-sup.fr (M. René-Martellet).

Keywords: Babesiosis; Dogs; Epidemiology; Molecular identification.

Abstract

Canine babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria*. In dogs, infection by these parasites usually induces a haemolytic syndrome that can be fatal when complicated. Canine babesiosis prevalence is high in France, with *Babesia canis* thought to be the main etiological agent of the disease. This article presents the results of a multiregional prospective longitudinal survey on canine babesiosis conducted in France from October 2006 to December 2007. A total of 836 cases were reported by veterinarians using a multiple choice questionnaire and blood samples from 70 dogs were analyzed using PCR-RFLP to identify species responsible for canine babesiosis cases across the country. The main clinical signs reported were lethargy (98%), anorexia (98%) and hyperthermia > 39°C (80%) followed by pale mucous membranes (54%), modification of urine aspect (45%) and splenomegaly (33%). The dog population at risk was mainly represented by young dogs living in rural areas. Twenty-five out of the 70 blood samples (36%) tested by diagnostic PCR were found to

contain *Babesia/Theileria* genus-specific DNA and all had profiles similar to that of *Babesia canis* genomic DNA after restriction fragment length polymorphism analyses. The survey results provide a reference for further molecular studies to assess the species and vectors involved in the transmission of the disease in France and across the Mediterranean basin.

1. Introduction

Canine babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* also called “piroplasms” (Irwin, 2009). In dogs, infection by these parasites usually induces a syndrome characterized by fever, lethargy, anorexia, anaemia and thrombocytopenia that can be fatal when complicated (Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011). However, the severity of the disease depends on various factors such as the *Babesia* species involved, the age and immune status of the host and the presence of other infections or diseases (Irwin, 2009). Four *Babesia* species known to infect dogs have been identified to date in Europe: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* and *Babesia microti*-like, also known as *Theileria annae* or *Babesia* sp. “Spanish dog” (Solano-Gallego and Baneth, 2011; Matijatko et al., 2012). In Europe, *B. canis* is the most widely distributed of these species, coinciding with the distribution of its known vector *Dermacentor reticulatus*. *B. vogeli* is more often found around the Mediterranean basin where *Rhipicephalus sanguineus* is the predominant tick species. The *Babesia microti*-like species seems to be centred in the northwest of Spain whereas the occurrence of *B. gibsoni* is reported more sporadically (Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011).

Canine babesiosis has a high prevalence in France (Bourdoiseau, 2006) and *B. canis* is thought to be the main etiological agent of the disease (Bourdoiseau, 2006; Beugnet and Marié, 2009). *B. vogeli* has recently been confirmed to be responsible for dog infections in

southern France but the prevalence of infection is not known (René et al., 2012). Climate change, vector migration and the increase in pet travel may all affect the future distribution of *Babesia* or *Theileria* including those that have yet to be detected by current molecular methods.

To provide a point of reference to study the epidemiology and clinical expression of canine babesiosis in France, we present here the results of a multiregional prospective survey conducted from October 2006 to December 2007. A total of 836 cases of canine babesiosis were reported by 41 veterinary clinics throughout mainland France and the main clinical and epidemiological data were collected from questionnaires answered by veterinarians. Seventy dog blood samples were analyzed using restriction fragment length polymorphisms of *Babesia*-specific PCR products (PCR-RFLP) to identify the species responsible for canine babesiosis in France.

2. Material and methods

2.1. Questionnaire records

Mainland France is divided into 96 administrative *départements* (for simplicity translated here as “departments”), which provides a convenient ‘grid’ for sampling clinics across the country. Forty-one veterinary clinics, one per department (Figure 1), agreed to participate in the study which corresponded to 2% of all veterinary clinics practising in France in 2007. Veterinary practices were selected taking into account the experience and the interest of veterinarians in the study. For all suspected cases of canine babesiosis (according to clinical criteria and/or blood smear results), veterinarians had to complete multiple choice questionnaires where the following information was requested (Table 1 and 2): examination date; age, sex, breed and lifestyle of dog; major clinical signs and results of blood smear examination (observation or not of typical forms of piroplasms).

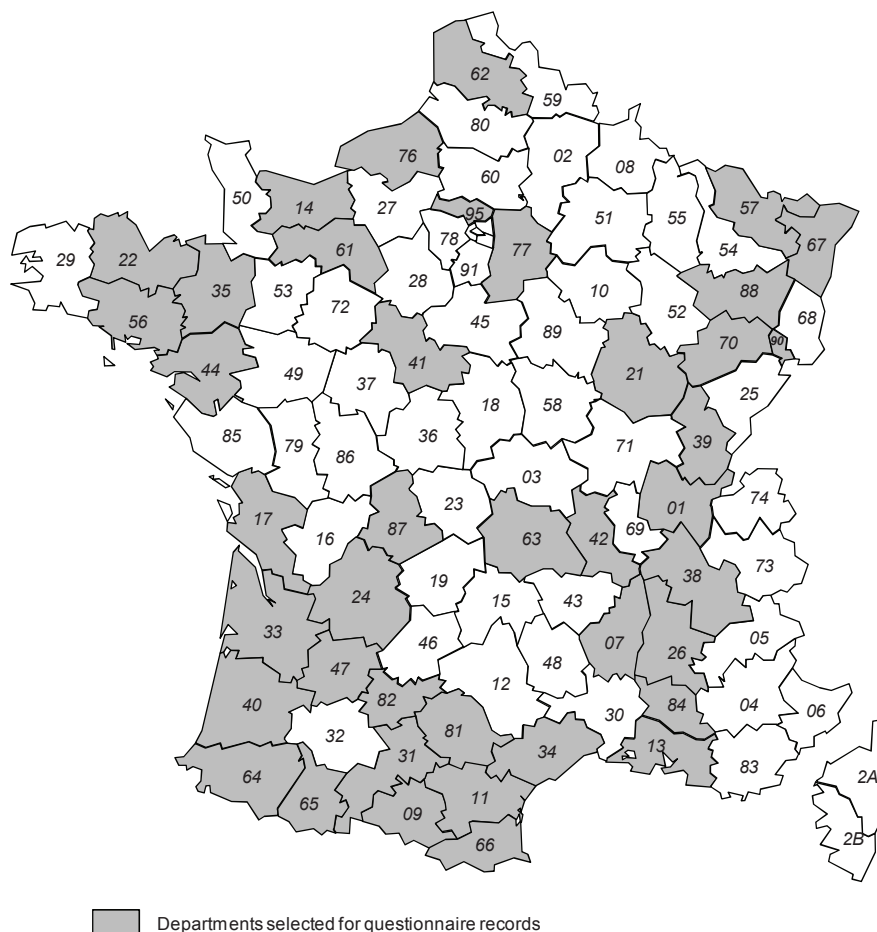


Figure 1: Geographical distribution of the 41 departments from which selected veterinary clinics provided information on canine babesiosis cases. Numbers in italics are those designating each department according to the French administrative system.

2.2. Blood sample collection and analysis

2.2.1. Blood sample collection and DNA extraction

Fresh blood was taken from ear punctures of all dogs suspected to have contracted canine babesiosis. Blood smears were prepared, air dried, stained using the May Grünwald Giemsa method and stored at room temperature before observation by light microscopy. If, based on clinical evidence and/or the blood smear observation, a suspected case required confirmation, veterinarians were asked to send blood smears and/or venous blood samples for microscopic confirmation or PCR analysis using franked parcels provided for this purpose. Venous blood

samples were taken from the cephalic or jugular veins of dogs using blood collection tubes containing anticoagulant EDTA and stored at 5 °C +/- 1 °C until analysis. Subsequent DNA extraction and PCR analysis were performed in the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases of VetAgro Sup (Marcy l'Etoile, France). Total DNA was extracted from blood/EDTA samples by applying 50 µl of each sample to FTA® Mini Cards (Whatman International Ltd., UK). Circles were punched out of cards with a 1.2 mm Harris Micro Punch (Whatman International Ltd., UK) and treated as recommended by the manufacturer, then transferred into PCR tubes for later processing.

2.2.2. DNA amplification

All DNA samples were analyzed by diagnostic PCR using primers Piro-A1 (5' AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC 3') and Piro-B (5' TTAAATACGAATGCCCCCAAC 3') that amplify about 450-bp of the 18S rRNA gene of *Babesia* sp. as previously described (Jefferies et al., 2003). Each FTA® punch was added to a 24 µL reaction mixture containing 100 µM of each deoxyribonucleotide, 12.5 pmol of each primer and 0.625 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) in the reaction buffer provided by the manufacturer. The following thermocycle conditions were used: 95 °C for 15 min; 62 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles at 94 °C for 30 s, 62 °C for 20 s and 72 °C for 30 s; and 72 °C for 7 min. Positive controls containing *B. canis* or *B. vogeli* DNA and negative controls without DNA were included in parallel. An aliquot (6 µl) of each amplified product was separated on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide at 130 V for 1 h and visualized under ultraviolet illumination.

2.2.3. RFLP-PCR analysis

DNA amplified from dog blood samples (10 μ L of the PCR reaction) was analyzed for restriction fragment length polymorphisms using *TaqI* and *HinfI* enzymes (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions using a method (Carret et al., 1999) adapted for amplification of 450-bp fragments (Jefferies et al., 2003). Products were then separated on 2% agarose gels stained with ethidium bromide at 130 V for 1 h and visualized under ultraviolet illumination.

RFLP-PCR profiles of samples were compared to profiles of *B. canis* and *B. vogeli* genomic DNA, as these were the only two species that had been detected at a molecular level in dog blood samples from France in 2007 (Cacciò et al., 2002; Shaw et al., 2003). The specificity of the original RFLP-PCR was tested *a posteriori* against RFLP-PCR profiles of *B. gibsoni* and *T. annae* genomic DNA.

2.3. Statistical analysis

Only babesiosis cases confirmed by observation of typical *Babesia* forms in blood smears or suspected cases confirmed by PCR were included in the study. Statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team, 2011). Seasonal case frequencies from December 2006 to November 2007 were compared to theoretical frequencies ($f = 0.25$ for each season) using a chi-squared test. When possible, data obtained from babesiosis cases reported in questionnaires were compared with those of a reference population of 165994 dogs presented for first examination in 2007 in veterinary clinics in mainland France (Panelvet SARL). As both the case and the control populations were large, the parametric Welch two-sample t-test was used to compare mean ages. The odds ratio was estimated for the age variable (quantitative value) transformed into age classes (qualitative value). Finally, the main clinical manifestations reported in the present study were compared, using a

Fischer's exact test, to clinical signs reported in a prospective study conducted during the same period in Poland (Adaszek et al., 2009).

3. Results

3.1. Questionnaire records and seasonal occurrence of canine babesiosis cases

Between October 2006 and December 2007, 41 veterinary clinics surveyed, each in a different department, recorded a total of 836 confirmed cases of canine babesiosis. The lowest number of cases per clinic was 1 and the highest was 183. Nine of the 41 veterinary clinics (in departments 09, 11, 22, 33, 34, 44, 47, 56 and 61) reported a total of 443 canine babesiosis cases regularly from the beginning to the end of the study, while reports from other clinics were more irregular. The case frequencies from these 9 clinics were further analyzed. Monthly case frequencies for clinics in the same region were added together (Figure 2). The three clinics in the region west of the Mediterranean basin (departments 09, 11 and 34), reported 296 babesiosis cases with the proportion of total cases varying between 2% and 12% throughout the year. The two clinics in the southern Atlantic coast region (departments 33 and 47) reported 46 cases with the proportion of total cases varying between 2% and 20% throughout the year except for November 2006, July 2007 and August 2007 when no cases were recorded. The four clinics in north-west France (departments 22, 44, 56 and 61), reported 101 cases with the proportion of total cases varying between 2% and 19% throughout the year except for the 3 months from June to August 2007 when no cases were recorded. Comparison of seasonal case frequencies from the 9 clinics between December 2006 and November 2007 showed that the frequency was lower in summer compared to other seasons with a statistical significance ($p = 8.8 \times 10^{-14}$). Statistical analysis of the seasonal case frequencies of the group of clinics in the region west of the Mediterranean basin gave similar results ($p = 3.4 \times 10^{-6}$).

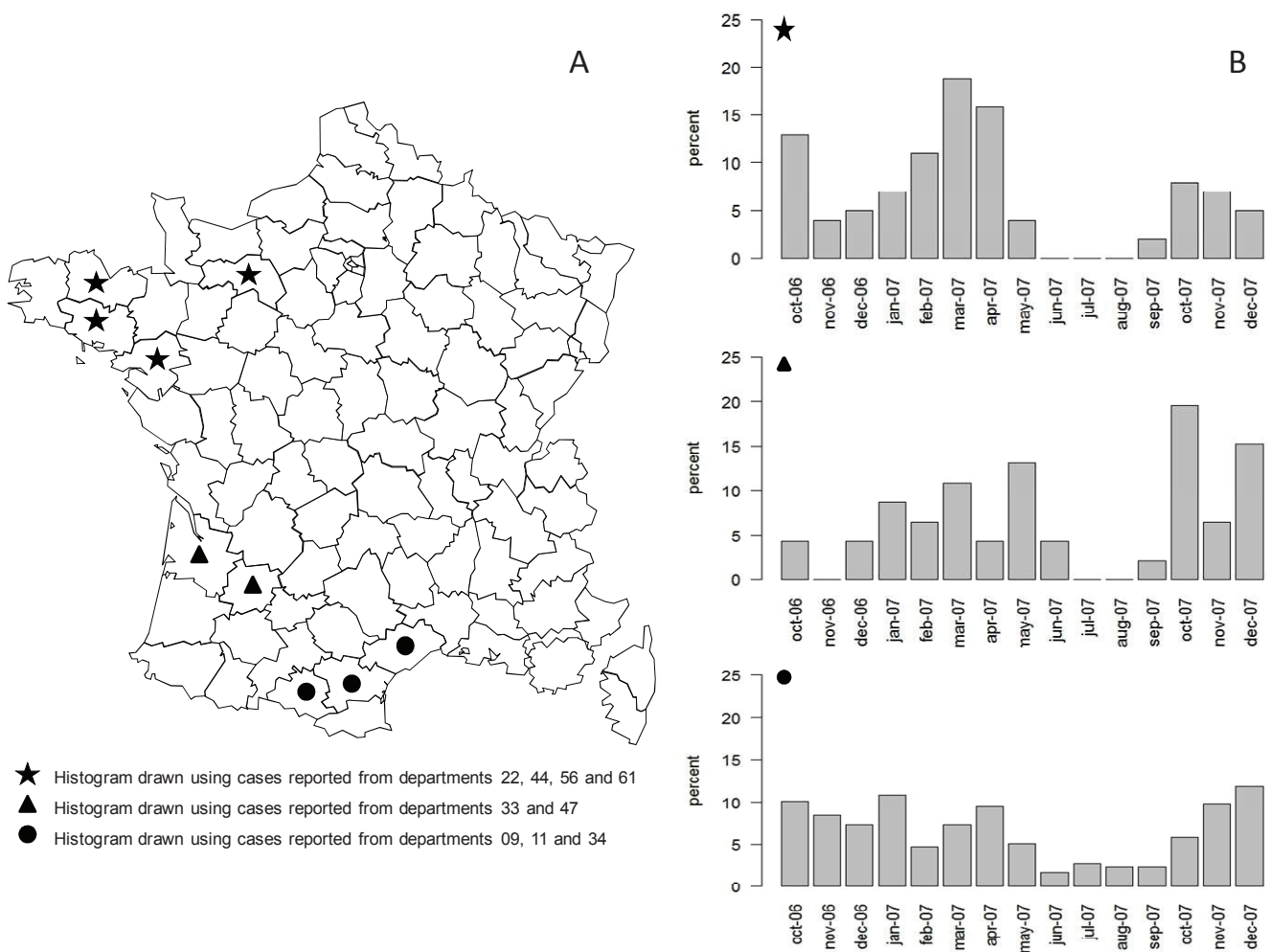


Figure 2: A. Regional distribution of the nine veterinary clinics that provided information regularly from the beginning to the end of the study. B. Histograms showing the frequency of canine babesiosis cases per month in the three regions shown in A.

3.2. Health records and clinical analysis

Health records and clinical data obtained from the 836 confirmed cases of canine babesiosis are summarized in Tables 1 and 2.

Table 1: Health records from canine babesiosis cases of the present study (cases) compared to those of the reference population

Recorded data		Cases	Reference population	Statistical analysis
Age	Mean	4.9 years old	6.3 years old	Welch two-sample t-test: $p < 2 \times 10^{-16}$
	Median	4.0 years old	5.8 years old	
	Age < 5 years old	52%	44%	OR ² = 1.39 [1.22; 1.60]; $p = 1.5 \times 10^{-6}$ reference class
	Age ≥ 5 years old	48%	56%	
Sex	Male	62%	—	
	Female	38%	—	
Lifestyle	Rural	85%	—	
	Urban	15%	—	
Disease observation	First	81%	—	
	Relapse / recurrence	19%	—	
Vaccination ¹		4%	—	

—: Not available

¹ Percentage of dogs vaccinated against canine babesiosis (with the vaccine current at the time of the study)

² P.value was estimated using chi.square test

The youngest dog affected was 2 months old and the oldest 17½ years old. Infected dogs were statistically younger than the control population ($p < 2 \times 10^{-16}$). Subsequent analysis according to age classes showed that the risk of infection was significantly higher in dogs less than 5 years old (OR = 1.39 [1.22; 1.60], $p = 1.5 \times 10^{-6}$) compared to dogs more than 5 years old. Males were more affected than females (62% and 38% respectively). Twenty-five percent of reported canine babesiosis cases were from male dogs aged 1-5 years old and 34% were from male dogs aged 5 years old or younger living in rural areas.

190 Table 2: Clinical records of confirmed or suspected cases of canine babesiosis in France from
 191 October 2006 to December 2007 as reported by 41 veterinary clinics

Clinical records ¹			Percentage ²
Behaviour	Lethargy		98%
	Normal		2%
Appetite	Anorexia		98%
	Normal		2%
Rectal temperature	>39°C		80%
	<39°C		20%
Colour of mucous membranes	Pale		54%
	Normal		37%
	Icteric		6%
	Congested		3%
Urine (aspect)	Normal		55%
	Modified		45%
Urinanalysis ³	Haemoglobinuria	Yes	66%
		No	34%
	Proteinuria	Yes	63%
		No	37%
	Bilirubinuria	Yes	78%
		No	22%
Spleen palpation	Normal		66%
	Splenomegaly		33%
Digestive system	Normal		78%
	Vomiting		12%
	Modified faeces		9%
	Other		0.2%
Skin	Normal		98%
	Oedemas		1%
	Other		0.6%
	Extremities modified		0.1%
Cardiopulmonary system	Normal		88%
	Polypnea		7%
	Cough		3%
	Dyspnea		1%
	Heart rhythm disorders		0.7%
	Other		0.4%
Musculoskeletal system	Normal		84%
	Painful joints		15%
	Other		1%
Nervous system	Normal		94%
	Loss of balance		4%
	Coma		0.7%
	Other		0.7%

¹ Clinical records suggested in the multiple choice questionnaire

² Percentage of observations within each category

³ Percentage of observations within 50% of the dogs in the study that were submitted to urinalysis

The main clinical signs reported by veterinarians were lethargy (98%), anorexia (98%) and hyperthermia $> 39^{\circ}\text{C}$ (80%). Pale mucous membranes were noted in 54% of cases, modification of urine aspect in 45% and splenomegaly in 33%. The urine of 50% of the dogs in the study was analyzed and haemoglobinuria was found in 66% of the samples tested, proteinuria in 63% and bilirubinuria in 78%. Other signs described were painful joints (15%), vomiting (12%), modified faeces (9%), polypnea (7%) and loss of balance (4%).

The main clinical manifestations reported in the present study were compared to previous surveys and are summarized in Table 3.

Table 3: Comparison of results from canine babesiosis surveys conducted in France and other European countries

	References	Present study	Mahl and Credo, 1995	Lasbleiz, 2007	Máthé et al., 2006	Adaszek et al., 2009
Epidemiological background	Country	France	France	France	Hungary	Poland
	Method	prospective study	single questionnaire	single questionnaire	retrospective study	prospective study
	Number of babesiosis cases / Number of questionnaires answered	836 / -	- / 1780	- / 892	63 / -	76 / -
	Year (duration)	2006-2007 (18 months)	1994	2005	1999-2000 (12 months)	2006-2007 (13 months)
Clinical manifestations	Lethargy	98% (1) ¹	95% (1) ²	S = 246 (1) ²	78% (2) ¹	
	Anorexia	98% (2)	86% (2)	S = 215 (2)	56% (4)	
	Hyperthermia	80% (3)	85% (3)	S = 208 (3)	84% (1)	82% (1) ¹
	Pale mucous membranes	54% (4)	49% (5)	S = 163 (5)	31% (6)	24% (3)
	Modified urine	45% (5)	77% (4)	S = 189 (4)	63% (3)	82% (1)
	Splenomegaly	33% (6)	24% (6)	S = 130 (6)	38% (5)	
	Icteric mucous membranes	6% (7)	16% (7)	S = 104 (7)	28% (7)	42% (2)

¹ percentage of dogs showing the clinical signs recorded as and when they were observed in prospective studies (rank)

² percentage (or score "S") of dogs showing the clinical signs according to an estimation of the frequency of appearance given by veterinarians in response to a single questionnaire (rank)

Statistical comparison of the main clinical signs observed in Poland (Adaszek et al., 2009) and in France (present study) showed that the percentage of dogs presenting icteric mucous

membranes and modified urine, including haematuria and urine with brown colour, was significantly higher ($p < 3.10^{-16}$ and $p < 6.10^{-10}$ respectively) in Poland than in France. Conversely, the percentage of dogs with pale mucous membranes was lower in Poland than in France ($p < 2.10^{-7}$) while no difference was found in the percentage of cases with hyperthermia ($p = 0.9$).

3.3. Molecular analysis of dog blood samples

3.3.1. RFLP-PCR analysis of blood samples

Restriction profiles using enzymes *TaqI* and *HinfI* were obtained for fragments of genomic DNA amplified from *B. canis* and *B. vogeli* (Figure 3). Comparison of the two restriction profiles generated for each species allowed *B. canis* and *B. vogeli* DNA to be clearly distinguished.

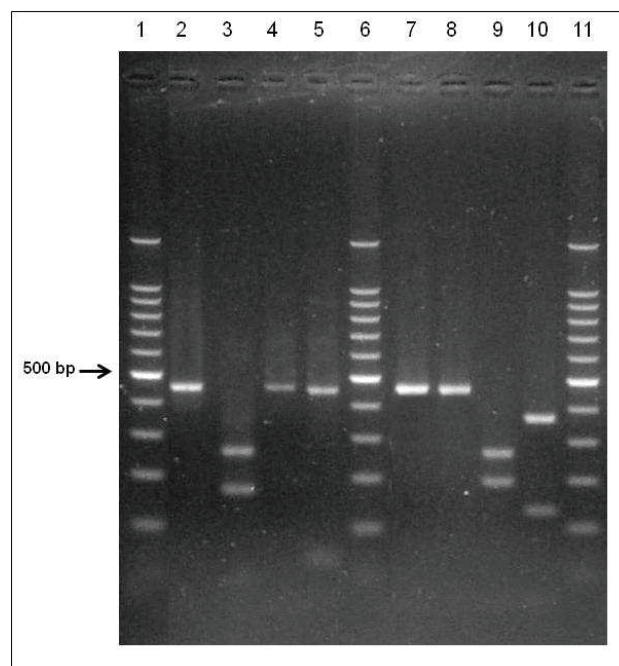


Figure 3: PCR-RFLP profiles of *Babesia/Theileria* DNA amplified with primers Piro-A1 and Piro-B, digested with *TaqI* or *HinfI* restriction enzymes, then separated on a 2% agarose gel. Molecular weight marker (lanes 1, 6 and 11). RFLP profile after *TaqI* digestion of DNA from

223 *B. canis* (lane 2), *B. vogeli* (lane 3), *B. gibsoni* (lane 4), and *Theileria annae* (lane 5). RFLP
224 profile after *HinfI* digestion of DNA from *B. canis* (lane 7), *B. vogeli* (lane 8), *B. gibsoni* (lane
225 9), and *T. annae* (lane 10).

226

227 Seventy blood samples from dogs with clinical signs suggestive of canine babesiosis were
228 analyzed using this method. The majority of blood samples were provided by veterinarians
229 participating in the survey in order to confirm suspected cases of babesiosis based on clinical
230 and/or blood smear observations. A few samples were sent by non-participating veterinarians
231 requesting diagnostic support. The geographical origin of dog bloods analyzed by PCR-RFLP
232 is shown in Figure 4. From these bloods, 25 (36%) were found to be positive in the *Babesia*
233 genus-specific diagnostic PCR (Figure 4). Subsequent RFLP analysis comparing these blood
234 samples to *B. canis* and *B. vogeli* controls showed that all positive samples (100%) had
235 restriction profiles similar to *B. canis*.

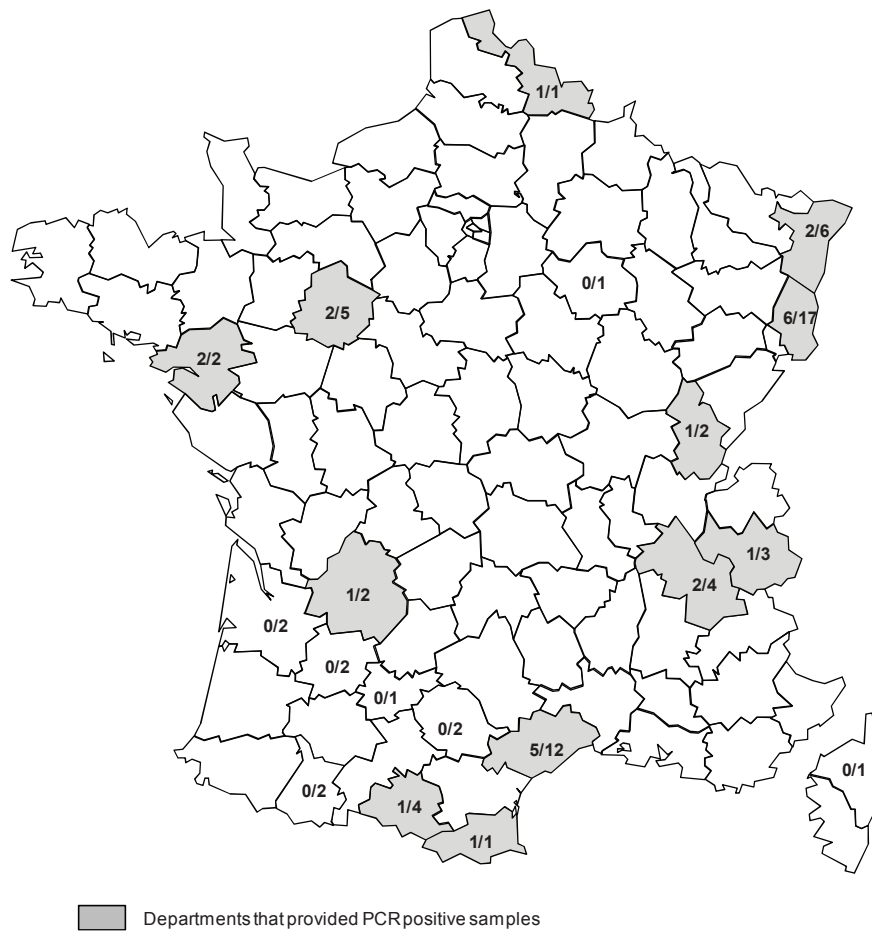


Figure 4: Origin of dog bloods analyzed by PCR-RFLP. Values indicate the number of blood samples testing positive for *Babesia* DNA (left) and the number analyzed (right) in departments that provided blood samples.

3.3.2. Verification *a posteriori* of RFLP-PCR specificity

Restriction profiles were obtained *a posteriori* for *B. gibsoni* and *T. annae* with enzymes *TaqI* and *HinfI* separately (Figure 3). The two restriction profiles generated for each species were distinct from those of the other species tested in this study. This result confirmed that neither of these species had restriction profiles similar to *B. canis* so were unlikely to be responsible for the confirmed infections identified in the survey.

4. Discussion

It is now clearly established that several *Babesia* or *Theileria* species may infect dogs in Europe with various clinical manifestations. To date, *B. canis* is the predominant of these species in most European countries (Solano-Gallego and Baneth, 2011; Matijatko et al., 2012). The epidemiology and clinical manifestations of canine babesiosis in France have been the subject of several reports (Mahl and Credo, 1995; Bourdoiseau, 2006; Lasbleiz, 2007). However, for studies covering large areas of the country, results were mostly obtained from answers to a single questionnaire submitted to veterinary clinics. The present study differs in that it consists of a prospective longitudinal study of a geographically widely distributed set of clinics who recorded the main epidemiological and clinical data as and when they were identified. A systematic validation of babesiosis cases was done through blood smear examination and/or PCR analysis. When completing the questionnaire, veterinarians were asked to validate whether or not they had observed typical forms of piroplasms. For any doubtful cases, veterinarians were encouraged to send blood smears or blood in EDTA to our laboratory for microscopic or PCR confirmation (free of charge). Thus, considering all the precautions taken, we believe there were few if any misidentifications.

The results of our survey show that the clinical manifestations were very consistent with previous descriptions of *B. canis* infections mostly including lethargy, anorexia, hyperthermia and paleness of mucous membranes and, frequently, urine coloration and splenomegaly (Boozer and Macintire, 2003; Bourdoiseau, 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011). However, when compared in more detail to data from countries where *B. canis* is also thought to be the main agent responsible for infections, slight differences were noted (see Table 3). Three studies conducted in France (Mahl and Credo, 1995; Lasbleiz, 2007; present study) and one in Hungary reported by Máthé et al. (2006) gave very similar results overall both in the frequency of clinical signs and in the order of their appearance. In contrast,

comparison of our results with those obtained in Poland during the same period (Adaszek et al., 2009) showed statistically significant higher rates of icteric mucous membranes and modified urines in Poland than in France suggesting that the disease has more severe clinical repercussions in Poland. Such differences might be explained by the existence of different *B. canis* strains with different pathogenicities as already suggested (Adaszek et al., 2009; Matijatko et al., 2012). However, as it is now well established that ticks are capable of transmitting several pathogen species to dogs and co-infections do occur, this possibility needs to be taken into account when describing the clinical course of natural infections.

Cases were compared to a reference population according to dog age. The study confirmed the higher risk of infection for young dogs (less than 5 years old) compared to older dogs, possibly as younger dogs are more likely to spend more time outdoors and may lack immunity against the species involved. The majority of recorded cases were intact or neutered males (516/836, 62%) compared to intact or neutered females (320/836, 38%). These results are similar to previous reports (Máthé et al., 2006). To our knowledge, it has not been demonstrated that males are particularly sensitive to *Babesia* infection so the observed difference may be attributed to an over-representation of males in the population of dogs at risk, in particular outdoor animals, as was previously suggested (Máthé et al., 2006).

In Europe and more specifically in France, canine babesiosis is generally known to occur during spring and autumn (Martinod and Gilot, 1991; Bourdoiseau, 2006). Overall in our study cases were regularly recorded throughout the year including winter with only one clear decrease in the number of cases in the 2007 summer (Fig. 2). Moreover, by combining and analysing results according to the geographical origin of cases, regional trends seem to emerge (Fig. 2B). In the northwest of the country and near the southwest coast, cases were recorded throughout the year including winter with two peaks of canine babesiosis incidences in spring and autumn and only one clear decrease in the 2007 summer. For reports from the

west of the Mediterranean basin, the impact of seasons on canine babesiosis incidence was less obvious as cases were recorded regularly throughout the year, including summer. The statistical comparison confirmed these observations as the difference in case frequencies between seasons was less significant for southern clinics alone ($p = 3.4 \times 10^{-6}$) than for northern and southern clinics taken together ($p = 8.8 \times 10^{-14}$). However, these data should be interpreted with caution, because of the limited number of veterinary clinics that provided data in each area. Our results contrast with previous reports of no or very sporadic cases during winter and summer (Martinod and Gilot, 1991; Máthé et al., 2006). Several factors could explain such differences. A mild winter might explain the higher incidence rates recorded in winter in our study compared to previous ones as these conditions are known to be favourable to the development of canine babesiosis (Bourdoiseau, 2006). The climatic conditions recorded in France in 2006 and 2007 support this hypothesis as the winter was mild and rainy throughout the country, and particularly in the northwest. However, these results can also be interpreted in terms of the potential distribution in time and space of vectors of the disease. In France, two tick species, *Dermacentor reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus*, are known or suspected vectors of canine babesiosis. *D. reticulatus* is present in a large northern part of the country and has two peaks in activity in spring and autumn, while *R. sanguineus* is mainly recorded in the Mediterranean basin and in this climate is mainly active from spring to summer (Gilot and Pérez-Eid, 1998, Dantas-Torres et al., 2011). Babesiosis cases presented in Figure 2B were recorded from western France and areas of west of the Mediterranean basin. The bimodal distribution of canine babesiosis cases in departments situated in northwest and southwest France may suggest the main role of *D. reticulatus* in the transmission the disease in these areas. Conversely, the occurrence of babesiosis cases throughout the year and in particular in summer in the west of the Mediterranean basin may suggest the involvement of both *D. reticulatus* and *R. sanguineus* vectors in this area.

At the time of the survey, only two *Babesia* species (*B. canis* and *B. vogeli*) had been detected at a molecular level in dog blood samples from France (Cacciò et al., 2002; Shaw et al., 2003). Thus, these two pathogens were chosen as positive controls in our molecular analysis. Since then *B. gibsoni* and *T. annae* were also confirmed to infect dogs in Europe, so it was decided to analyze blood samples *a posteriori* using the same RFLP method (Solano-Gallego and Baneth, 2011). While the results supported our original conclusion, we cannot exclude the possibility that other *Babesia* or *Theileria* species have restriction profiles identical to the *B. canis* profile because no amplified DNA from blood samples tested in the study were sequenced. Finally, none of the blood samples from cases in areas in the Mediterranean basin were collected during the period of *R. sanguineus* activity, so it is not possible to draw conclusions about the prevalence of *B. vogeli* infections in France.

In conclusion, results of this prospective longitudinal study confirmed that canine babesiosis was still an endemic disease in 2006 and 2007 in France with significant differences between regions and seasons. Knowledge of the clinical course of infection is increased as a result of the many observations. Molecular analysis of dog blood samples show that *B. canis* was probably the main species responsible for canine babesiosis cases at the time of the study and highlights the usefulness of the *TaqI* and *HinfI* RFLP-PCR method for epidemiological studies. It is imperative to analyze the bloods of suspected or confirmed cases of canine babesiosis at a molecular level and to improve knowledge of the role of both *D. reticulatus* and *R. sanguineus* vectors in the transmission of the disease. Reliable methods will also be needed to distinguish between single or multiple tick-borne infections in future studies.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

349

350 **Acknowledgements**

351 This work was supported by a grant from MSD Animal Health (Boxmeer, Netherlands). We
352 sincerely thank all the veterinarians who agreed to participate in the study and Pr T. Schetters
353 (MSD Animal Health, Boxmeer, Netherlands), Pr K. Pfister (Institute of Comparative
354 Tropical Medicine and Parasitology, University of Munich, Germany), Pr A. Gorenflot (UFR
355 Pharmacy, Cell and Molecular Biology Laboratory, Montpellier, France) and Dr A. T.
356 Camacho Garcia (Vigo, Spain) for providing *Babesia* and *Theileria* samples.

357

358 **References**

359 Adaszek, Ł., Winiarczyk, S., Skrzypczak, M., 2009. The clinical course of babesiosis in 76
360 dogs infected with protozoan parasites *Babesia canis canis*. Pol. J. Vet. Sci. 12, 81-87.

361 Beugnet, F., Marié, J.L., 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in
362 Europe. Vet. Parasitol. 163, 298-305.

363 Boozer, A.L., Macintire, D.K., 2003. Canine babesiosis. Vet. Clin. North Am. Small Anim.
364 Pract. 33, 885-904.

365 Bourdoiseau, G. and Renard, N., 2005. Résultats d'une enquête en France sur les cas suspectés
366 ou confirmés de babésiose chez le chien (in French). Nouveau Prat. Vét. Août-septembre
367 2005, 37-42.

368 Bourdoiseau, G., 2006. Canine babesiosis in France. Vet. Parasitol. 138, 118-125.

369 Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda,
370 S.B., Pieniazek, N.J., 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia*
371 *canis vogeli* from naturally infected European dogs. Vet. Parasitol. 106, 285-292.

372 Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout, É., Moubri, K., Schetters, T.P.,
373 Gorenflot, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*:

differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 298-301.

Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Otranto, D., 2011. Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. Parasitology 138, 527-536.

Gilot, B., Pérez-Eid, C., 1998. Bio-écologie des tiques induisant les pathologies les plus importantes en France. Méd. Mal. Infect. 28, 325-334.

Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasit. Vectors 2 (Suppl. 1), S4.

Jefferies, R., Ryan, U.M., Muhlneckel, C.J., Irwin, P.J., 2003. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. J. Parasitol. 89, 409-412.

Lasbleiz M., 2007. Situation actuelle de la babésiose canine en France: bilan d'une enquête nationale (in French). Thèse Doct. Vét. Nantes, 157pp.

Mahl P. and Credoiz I., 1995. Epidémiologie de la babésiose canine en France (in French). In: Proceedings of the CNVSPA, France.

Martinod, S., Gilot, B., 1991. Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). Exp. Appl. Acarol. 11, 215-222.

Máthé, A., Vörös, K., Papp, L., Reiczigel, J., 2006. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). Acta Vet. Hung. 54, 367-385.

Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P., 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? Trends Parasitol. 28, 99-105.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

399 René, M., Chêne, J., Beauvils, J.P., Valiente Moro, C., Bourdoiseau, G., Mavingui, P.,
400 Chabanne, L., 2012. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in
401 naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. Vet.
402 Parasitol., 187, 399-407.

403 Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J., Kenny, M.J., 2003.
404 Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from
405 abroad diagnosed by PCR. Vet. Rec. 152, 176-177.

406 Solano-Gallego, L. and Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats - Expanding
407 parasitological and clinical spectra. Vet. Parasitol. 181, 48-60.

408

409

1.3. Conclusion

Cette enquête a permis d'actualiser les connaissances sur la babésiose canine en France et d'amener des éléments de référence quant aux principaux signes cliniques observés, aux facteurs de risque d'infection et aux espèces de piroplasmes potentiellement incriminées. Les principaux signes cliniques rapportés, par ordre de fréquence, ont été de la léthargie (98%), de l'anorexie (98%), une hyperthermie supérieure à 39°C (80%), des muqueuses pâles (54%), une modification de l'aspect des urines (45%) et une splénomégalie (33%). Une atteinte préférentielle des jeunes chiens au mode de vie rural a été constatée. Sur les 70 échantillons de sang testés, 25 (36%) ont donné un résultat positif à la recherche d'ADN de protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria*. Après analyse RFLP des produits de PCR, tous ces échantillons (100%) ont présenté des profils de restrictions similaires à *Babesia canis*. L'analyse de la distribution des cas en fonction des saisons met en évidence des variations régionales. Des cas de babésiose sont rapportés dans le bassin méditerranéen en période estivale laissant supposer un rôle vecteur potentiel de *R. sanguineus* dans ce territoire. Aucun des échantillons de sang analysés, n'ayant été récolté dans le Sud de la France pendant la période d'activité des tiques *R. sanguineus* cette étude n'a pas permis d'estimer la prévalence d'infection de chiens par *Babesia vogeli*. Aussi, cette étude supporte t'elle la prévalence plus élevée de l'infection par *Babesia canis* chez les chiens suspects ou confirmés atteints (par observation microscopique des parasites) de babésioses canines en France. La caractérisation génétique d'un plus grand nombre d'échantillons paraît indispensable afin de mieux évaluer le rôle vecteur potentiel des deux espèces *D. reticulatus* et *R. sanguineus* dans la transmission dans la maladie dans le bassin méditerranéen français. En particulier, pour caractériser le rôle vecteur spécifique de *R. sanguineus* dans la transmission de la maladie, il convient, en premier lieu, d'identifier des sites caractérisés par une présence soutenue du vecteur *R. sanguineus* sur les chiens. Cette recherche de sites d'étude a fait l'objet d'une enquête préliminaire présentée en deuxième partie de ce chapitre.

2. Enquête préliminaire pour l'identification des sites d'étude

2.1. Introduction

Les cartes présentant la répartition des deux vecteurs probables de babésiose canine en France, *R. sanguineus* et *D. reticulatus* laissent supposer une présence soutenue du premier et une absence du second sur l'ensemble du pourtour méditerranéen français (Figure 11, page 53). L'étude de la distribution dans le temps des cas de babésiose canine dans les départements du Sud de la France (Publication n°1) suggère le rôle vecteur potentiel des deux espèces *D. reticulatus* et *R. sanguineus* dans la transmission de la maladie dans l'Ouest du bassin méditerranéen. Les limites de la distribution des espèces de tiques ne sont pas clairement établies et sont susceptibles d'être modifiées sous l'effet de facteurs climatiques et anthropiques (urbanisation, développement des transports, déplacements de chiens notamment). Pour mieux caractériser le rôle des tiques *R. sanguineus* dans la transmission de la maladie, nous avons décidé de mettre en place dès le début de ce travail une surveillance des vecteurs et plus particulièrement des tiques, sur les chiens, dans un territoire couvrant une grande partie du Sud de la France, de la région lyonnaise à la Corse.

2.2. Méthodologie

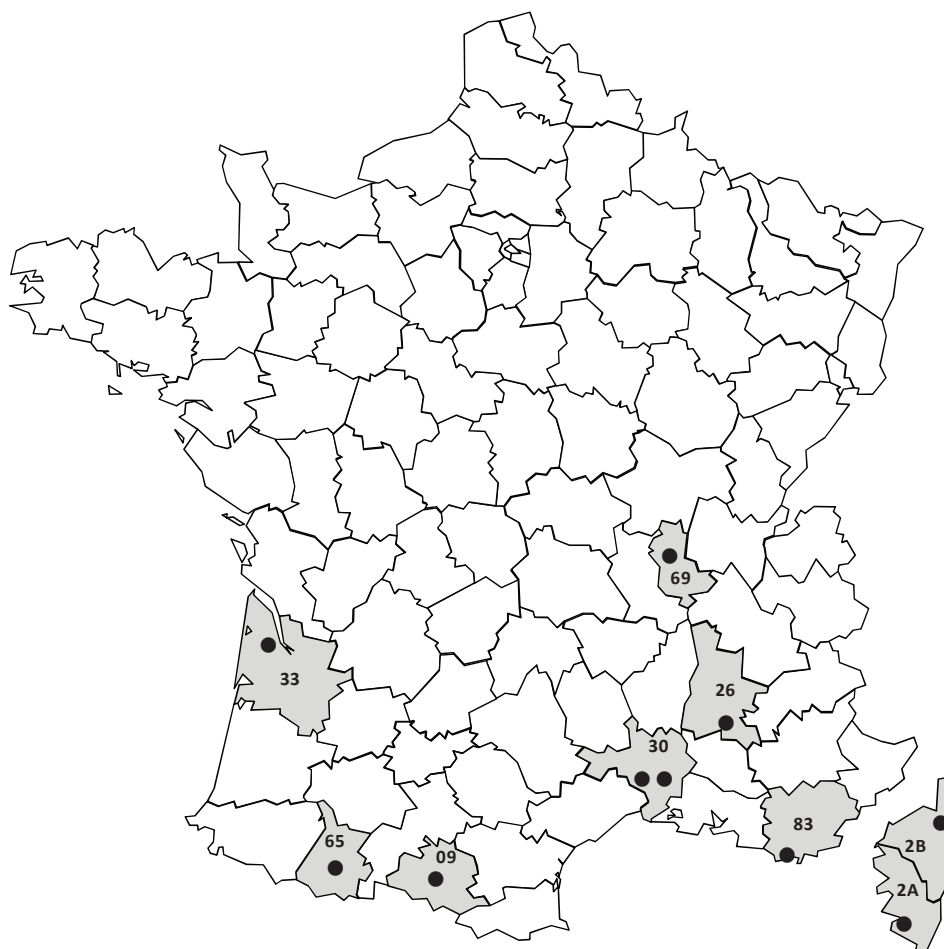
2.2.1. Sélection et définition des sites d'étude

Cette étude préliminaire a été conduite de mars à juillet 2010 (inclus). Une étude approfondie préalable de la bibliographie nous a permis de mieux cibler les régions susceptibles d'héberger le vecteur *R. sanguineus*. Puis, nous avons contacté des vétérinaires, des éleveurs et des sociétés de protection des animaux afin d'évaluer la faisabilité de notre projet dans leur clinique ou leur chenil. Ce travail préliminaire a permis de sélectionner 6 cliniques vétérinaires, le centre hospitalier de VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon et 3 chenils répartis dans 9 départements dont les deux départements de Corse.

Les sites dans lesquels la présence du vecteur *R. sanguineus* était fortement suspectée ont été soumis à un protocole d'échantillonnage individuel (EI). Ceux pour lesquels sa présence était incertaine ont été orientés vers un échantillonnage collectif (EC). Ces deux méthodes d'échantillonnage seront détaillées par la suite. Les sites et leurs principales caractéristiques sont présentés dans le Tableau 5 et sur la Figure 17.

Tableau 5 : Principales caractéristiques des sites et modalités de récolte des échantillons.

Département	Villes	Caractéristiques	Modalités de récolte des tiques (sur chiens)
9 (Ariège)	Montjoie en Couserans	Clinique vétérinaire	Echantillonnage collectif
2A (Corse du Sud)	Ajaccio	Chenil	Echantillonnage individuel
2B (Haute-Corse)	Bastia	Clinique vétérinaire	Echantillonnage individuel
26 (Drôme)	La Bégude de Mazenc	Clinique vétérinaire	Echantillonnage individuel
30 (Gard)	Sommières	Clinique vétérinaire	Echantillonnage individuel
	Calvisson	Clinique vétérinaire	Echantillonnage individuel
33 (Gironde)	Saint Laurent du Médoc	Chenil de 200 chiens de chasse à courre	Echantillonnage collectif
65 (Hautes-Pyrénées)	Trie sur Baïse	Clinique vétérinaire	Echantillonnage collectif
69 (Rhône)	Marcy l'étoile	Campus Vétérinaire (VetAgro Sup)	Echantillonnage individuel
83 (Var)	Toulon	Chenil	Echantillonnage collectif

**Figure 17** : Localisation géographique des sites d'étude. Les noms des départements (identifiés sur la carte par leur numérotation administrative) sont présentés dans le Tableau 5.

2.2.2. Récolte des échantillons

Dans la mesure du possible, la méthode d'échantillonnage individuel (1 individu = 1 chien) a été privilégiée. Cette méthode permet de faire le lien entre les agents pathogènes détectés dans le sang des hôtes et les agents pathogènes détectés chez les vecteurs.

2.2.2.1. Echantillonnage individuel

Cette méthode d'échantillonnage a été mise en place dans les sites à forte présomption de la présence du vecteur *R. sanguineus*. Il a été demandé aux membres du réseau de sélectionner des chiens dits « candidats » sur la base des deux critères suivants : (1) la mise en évidence d'infestation par les tiques et/ou (2) la suspicion clinique d'une « maladie transmise par les tiques » (en incluant notamment toutes les anémies hémolytiques). Sur ces chiens « candidats » devaient être réalisés, lorsque le cas le permettait, (i) une prise de sang, (ii) un étalement de sang frais sur lame et (iii) la récolte des tiques le cas échéant. Des dispositifs d'envois pré-identifiés et préaffranchis ont été mis à la disposition des participants. Chaque dispositif contenait (i) un tube sec et un tube avec anticoagulant (EDTA) pour la réalisation d'une prise de sang, (ii) une lame pour la réalisation d'un étalement de sang frais, (iii) un tube contenant de l'alcool 70% non modifié pour la récolte et la conservation des tiques et (iv) une fiche de commémoratifs, à remplir en présence du propriétaire de l'animal (Annexe 2). Cette fiche avait pour objectif de recueillir des informations générales sur les animaux et leurs éventuels antécédents de déplacements récents. Les informations ont été par la suite analysées et tous les animaux n'entrant pas dans les critères d'inclusion ou ayant des antécédents avérés de déplacements ont été retirés de l'analyse.

2.2.2.2. Echantillonnage collectif

Dans les sites d'études où la présence du vecteur était incertaine ou lorsque le contexte (présence de personnel habilité à réaliser des prises de sang notamment) ne permettait pas la réalisation d'un échantillonnage individuel, une méthode d'échantillonnage collectif a été engagée. Des tubes de 20 mL contenant de l'alcool à 70% non modifié, pré-identifiés (site et date de collecte) ont été fournis. Il était demandé aux participants du réseau (éleveurs, animaliers, vétérinaires, assistantes vétérinaires) de déposer dans ces tubes toutes les tiques trouvées sur des chiens au cours d'une semaine, à raison d'un tube par semaine, et de faire parvenir tous les 15 jours les tubes quel que soit le résultat de leurs récoltes (présence ou absence de tiques). Dans le cas des chenils, il était en outre demandé de préciser avec chaque

envoi, les éventuels traitements antiparasitaires effectués sur les animaux ou dans les locaux et/ou les éventuels antécédents de déplacement des animaux. Dans le cas d'un déplacement avéré en dehors du département, les échantillons récoltés ont été écartés de l'analyse.

2.2.3. Identification des tiques

A réception des échantillons, les tiques ont été identifiées (genre, espèce, stade) sur critères morphologiques sous loupe binoculaire à l'aide de clés d'identification (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007). Les tiques *Ixodes ricinus* ont été identifiées jusqu'à l'espèce. Pour les tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* », nous avons choisi d'arrêter l'identification à l'appartenance ou non à ce groupe. Pour les tiques des autres genres, nous sommes limités à une identification du genre. Quelques spécimens sélectionnés au hasard au sein de chaque genre ont été identifiés jusqu'à l'espèce.

2.2.4. Calcul du taux d'infestation

Le taux d'infestation de chiens par des tiques par département a été évalué grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{nombre de chiens porteurs de tiques de chaque espèce par département}}{\text{nombre total de chiens porteurs de tiques dans le département}} \times 100$$

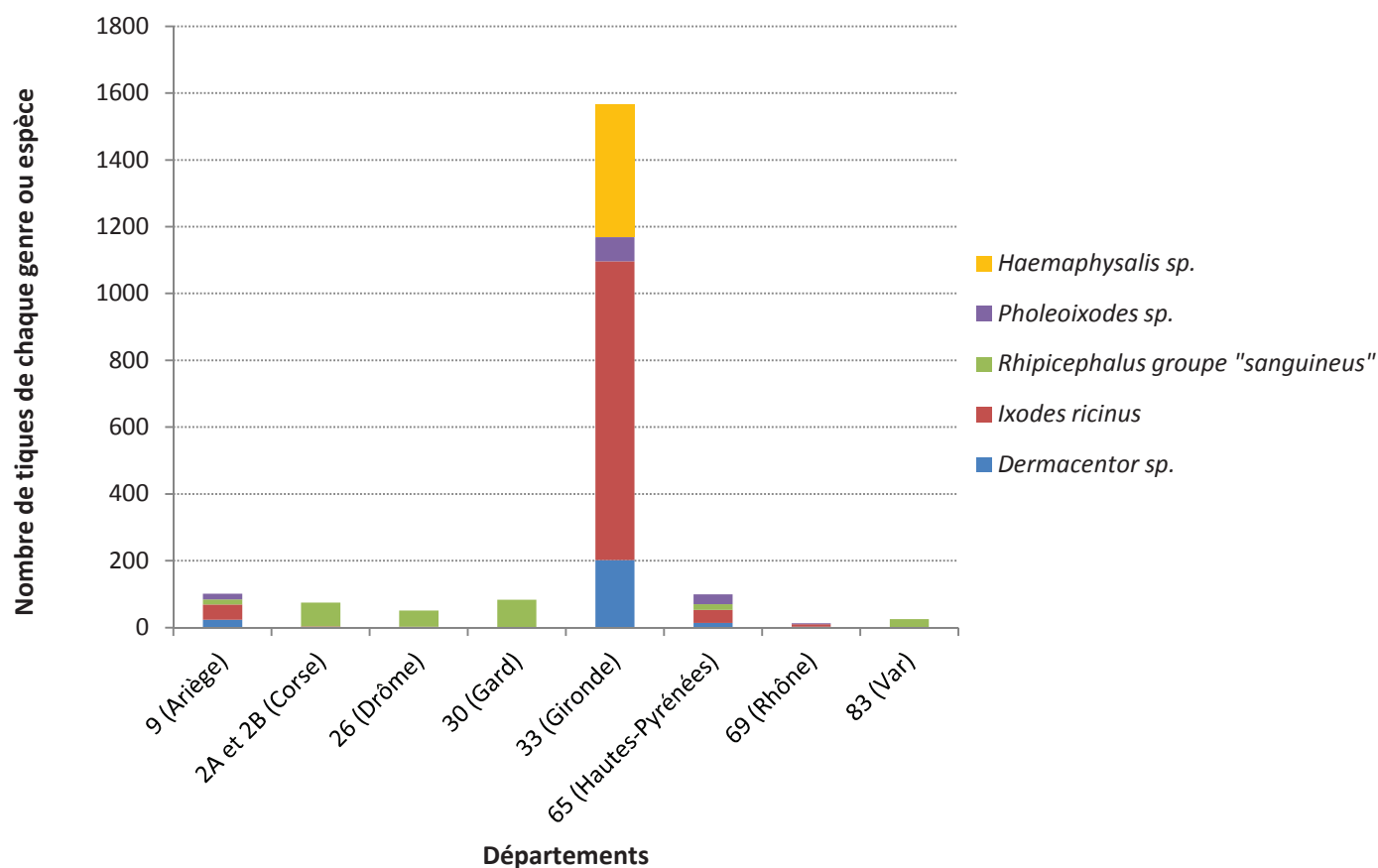
2.3. Résultats

2.3.1. Récolte des tiques toutes méthodes confondues

Les résultats de la récolte des tiques par département, toutes méthodes confondues (échantillonnage individuel ou collectif), et de leur identification sont présentés dans le Tableau 6 et sur les Figures 18 et 19.

Tableau 6 : Récolte et identification des tiques, toutes méthodes confondues.

Genre, groupe d'espèces ou espèce de tique identifiés ¹					
Département	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Rhipicephalus</i> groupe "sanguineus"	<i>Phleboixodes</i> sp.	<i>Haemaphysalis</i> sp.
9 (Ariège)	23/101 (22,8%) ²	46/101 (45,5%)	15/101 (14,9%)	17/101 (16,8%)	0/101 (0,0%)
2A et 2B (Corse)	0/75 (0,0%)	3/75 (4,0%)	72/75 (96,0%)	0/75 (0,0%)	0/75 (0,0%)
26 (Drôme)	0/51 (0,0%)	2/51 (3,9%)	49/51 (96,1%)	0/51 (0,0%)	0/51 (0,0%)
30 (Gard)	0/83 (0,0%)	0/83 (0,0%)	83/83 (100,0%)	0/83 (0,0%)	0/83 (0,0%)
33 (Gironde)	202/1566 (12,9%)	894/1566 (57,1%)	0/1566 (0,0%)	73/1566 (4,7%)	397/1566 (25,4%)
65 (Hautes-Pyrénées)	14/99 (14,1%)	39/99 (39,4%)	17/99 (17,2%)	29/99 (29,3%)	0/99 (0,0%)
69 (Rhône)	2/13 (15,4%)	8/13 (61,5%)	0/13 (0,0%)	3/13 (23,1%)	0/13 (0,0%)
83 (Var)	0/25 (0,0%)	0/25 (0,0%)	25/25 (100,0%)	0/25 (0,0%)	0/25 (0,0%)
Total	241/2013 (12,0%)	992/2013 (49,3%)	261/2013 (13,0%)	122/2013 (6,1%)	397/2013 (19,7%)

¹ identification sur critères morphologiques uniquement² Nombre de tique de l'espèce / Nombre total de tiques récoltées dans le département (%)**Figure 18** : Nombre et identification des tiques (espèces, groupe d'espèces ou genres) récoltées par département.

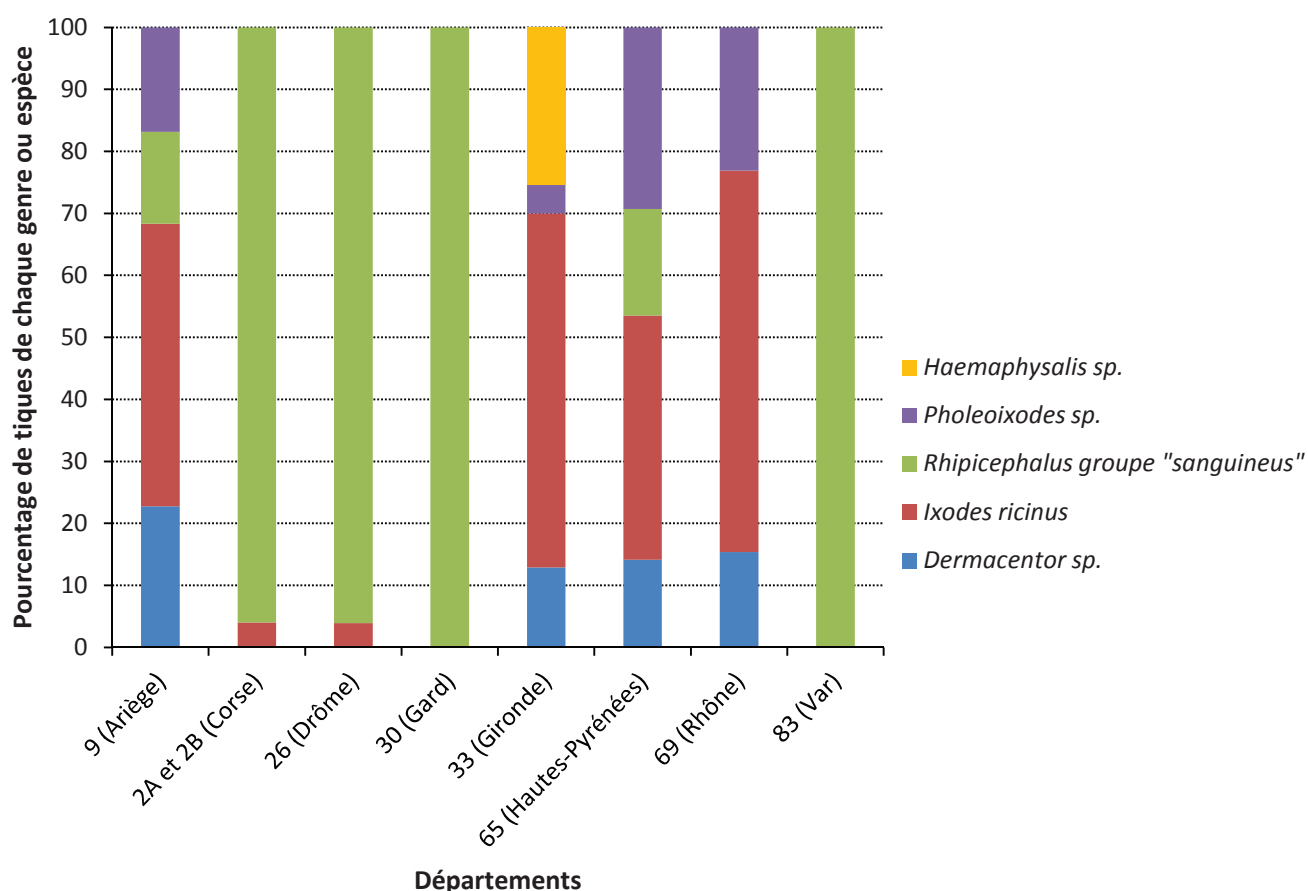


Figure 19 : Pourcentage de tiques (espèce, groupe d'espèces ou genres) récoltées par département.

De mars 2010 à juillet 2010, un total de 2013 tiques de 5 genres différents a été récolté et identifié dans les 9 départements inclus dans le suivi. Ces tiques comprennent 992 *I. ricinus* (49,3%), 397 *Haemaphysalis* sp. (19,7%), 261 *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » (13%), 241 *Dermacentor* sp. (12%) et 122 *Pholeoixodes* sp. (6,1%). Le chenil de chiens de chasse à courre de Gironde a fourni à lui seul 1566 échantillons (soit 77,8% des tiques récoltées). Dans les départements de l'Ariège (09) et des Hautes-Pyrénées (65), les quatre genres *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* et *Pholeoixodes* ont été trouvés. Dans ces deux départements, 32 tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » ont été identifiées dans les tubes d'échantillonnages collectifs entre le 05/04/2010 et le 09/05/2010. Elles n'ont jamais été retrouvées au cours des semaines qui ont suivi. Dans le Rhône, des tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » n'ont été mises en évidence qu'une seule fois (8 spécimens) chez un chien des gens du voyage dont les antécédents de déplacements n'étaient pas connus. Ces spécimens ont été exclus de l'étude. Le département de la Gironde (33) est le seul dans lequel

des tiques du genre *Haemaphysalis* ont été récoltées. Ce sont les sites des départements du Gard (30), de la Drôme (26), du Var (83) et de Corse (2A et 2B) qui ont fourni le plus grand nombre de tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* » (en nombre total et en pourcentage par rapport aux autres genres ou espèces). Les quelques spécimens de tiques des genres *Haemaphysalis*, *Dermacentor* et *Pholeoixodes* pour lesquels une identification morphologique plus précise a été réalisée ont permis de rapprocher ces échantillons des espèces *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor reticulatus* et *Pholeoixodes hexagonus* respectivement.

2.3.2. Récolte des tiques par la méthode d'échantillonnage individuel

De mars 2010 à juillet 2010, un total de 48 chiens a été soumis à un échantillonnage individuel suite à la mise en évidence d'une infestation par des tiques. Sur ces 48 chiens, 222 tiques ont été récoltées. Les résultats de leur identification par département et le rapport du nombre total de tiques récoltées sur le nombre de chiens échantillonnés sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Récolte et identification des tiques par échantillonnage individuel.

Département	Tiques (Espèce identifiée) ¹				N tiques / N chiens
	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Rhipicephalus</i> groupe " <i>sanguineus</i> "	<i>Pholeoixodes</i> sp.	
2A et 2B (Corse)	0/75 (0,0%) ²	3/75 (4,0%)	72/75 (96,0%)	0/75 (0,0%)	75/22 (3,4) ³
26 (Drôme)	0/51 (0,0%)	2/51 (3,9%)	49/51 (96,1%)	0/51 (0,0%)	51/6 (8,5)
30 (Gard)	0/83 (0,0%)	0/83 (0,0%)	83/83 (100,0%)	0/83 (0,0%)	83/11 (7,5)
69 (Rhône)	2/13 (15,4%)	8/13 (61,5%)	0/13 (0,0%)	3/13 (23,1%)	13/9 (1,4)
Total	2/222 (0,9%)	13/222 (5,9%)	204/222 (91,9%)	3/222 (1,4%)	222/48 (4,6)

¹ identification sur critères morphologiques uniquement

² Nombre de tique de l'espèce / Nombre total de tiques récoltées dans le département (%)

³ Nombre total de tiques récoltées / Nombre de chiens échantillonnés (rapport)

Sur les 222 tiques récoltées sur des chiens par échantillonnage individuel dans les départements du Gard, de la Drôme, du Rhône et en Corse, 204 (91,9%) ont été identifiées comme appartenant à *Rhipicephalus* groupe « *sanguineus* », 13 (5,9%) à l'espèce *Ixodes ricinus* et 3 (1,4%) et 2 (0,9%) aux genres *Dermacentor* et *Pholeoixodes* respectivement. Le nombre moyen de tiques par chien a été évalué à 1,4 (minimum) dans le Rhône et à 8,5

(maximum) dans la Drôme. A partir de ces résultats, nous avons pu évaluer le taux d'infestation des chiens par département pour les 4 espèces (groupe d'espèces ou genre) de tiques récoltées (Tableau 8).

Tableau 8 : Taux d'infestation de chiens par département.

Département	Taux d'infestation par des tiques des espèces (groupe d'espèces ou genre)				
	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>I. ricinus</i>	<i>Rhipicephalus</i> groupe "sanguineus"	<i>Pholeoixodes</i> s	Inf. mixte ²
2A et 2B (Corse)	0/22 (0,0%)	2/22 (9,1%)	20/22 (90,9%)	0/22 (0,0%)	0/22 (0,0%)
26 (Drôme)	0/6 (0,0%)	1/6 (16,7%)	4/6 (66,7%)	0/6 (0,0%)	1/6 (16,7%) ¹
30 (Gard)	0/11 (0,0%)	0/11 (0,0%)	11/11 (100,0%)	0/11 (0,0%)	0/11 (0,0%)
69 (Rhône)	2/9 (22,2%)	5/9 (55,6%)	0/9 (0,0%)	2/ (22,2%)	0/9 (0,0%)

¹ un chien co-parasité par *I. ricinus* et *R.* groupe "sanguineus"

² Inf. mixte : infestation mixte

Sur les 48 chiens infestés par des tiques inclus dans l'étude, un seul (2,1%) présentait une infestation par plusieurs espèces de tiques (infestation mixte). Dans les départements du Gard, de Corse (Haute-Corse et Corse du Sud) et de la Drôme, les taux d'infestation par les tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » ont été évalués à 100%, 90,9% et 66,7% respectivement.

2.4. Discussion

Le principal objectif de cette étude préliminaire était d'identifier des sites caractérisés par une présence majoritaire et soutenue du vecteur *R. sanguineus* sur les chiens, afin de répondre aux interrogations soulevées au début de ce travail. La mise en place conjointe, dès le début de l'année 2010, de méthodes d'échantillonnages individuel et collectif a permis de répondre à nos attentes. A la fin de l'été 2010, trois régions d'intérêt : le Gard, la Corse et la Drôme (région de Montélimar), dans lesquelles les tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » ont été majoritaires (97,6% des tiques récoltées sur les chiens dans ces trois régions) ont pu être identifiées. La présence de tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » a été également détectée dans d'autres départements (09 et 65 notamment) du Sud de la France, mais leur période d'activité, sur la période de suivi, a été de courte durée. Ces résultats sont cohérents avec les données actuelles de distribution des tiques du genre *Rhipicephalus* en France. Les tiques *Rhipicephalus* du groupe « sanguineus » ont été récoltées

majoritairement dans les régions au climat méditerranéen (dans le département de la Drôme la limite du climat méditerranéen étant habituellement matérialisée par la ville de Montélimar) et de façon plus anecdotique en dehors de ces régions comme cela était attendu (Pérez-Eid, 2007). Des études similaires, couvrant une plus longue période et une plus grande partie du territoire, devront toutefois être entreprises pour conclure sur l'aire de distribution de cette espèce et sa prévalence en fonction des saisons en dehors des régions méditerranéennes.

Parmi les tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* », tel que défini par Pegram et al. (1987a, 1987b), seules les espèces *R. sanguineus* s.s., *R. turanicus* et *R. pusillus* ont été à ce jour décrites dans le bassin méditerranéen français (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007). *R. sanguineus* s.s. a une spécificité étroite pour le chien, son hôte préférentiel (Dantas-Torres, 2008), alors que *R. turanicus* semble pouvoir parasiter indifféremment les ongulés (bovins, ovins, équins) et les carnivores (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007). *R. pusillus*, quant-à-elle, est une espèce essentiellement parasite du lapin de Garenne (Pérez-Eid, 2007). Les spécimens récoltés au cours de ce travail correspondent donc très probablement à l'une ou l'autre des espèces *R. sanguineus* s.s. ou *R. turanicus*.

Les échantillonnages ont permis de récolter 2013 tiques sur des chiens parmi lesquels 5 genres ont été identifiés : *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Pholeoixodes* et *Haemaphysalis*. Le nombre de tiques récoltées a été très variable d'un département à l'autre. Le chenil de chiens de chasse à courre de Gironde notamment a fourni à lui seul 1566 tiques. Le nombre considérable de tiques récoltées dans ce chenil peut s'expliquer par un contexte particulièrement favorable à une forte infestation par des tiques. En effet, cette meute était constituée d'un nombre important de chiens (environ 200), aucun traitement antiparasitaire externe n'avait été administré tout au long du suivi et les chiens étaient particulièrement exposés puisqu'ils réalisaient des sorties hebdomadaires, souvent en forêt.

Les résultats de la récolte de tiques, toutes méthodes confondues, et les pourcentages de tiques (espèces, groupes d'espèces ou genres) par département doivent être interprétés avec prudence. En effet, ces données intègrent les résultats d'échantillonnages collectifs pour lesquels, dans les départements de l'Ariège (09) et des Hautes-Pyrénées (65) notamment, les informations sur les antécédents de déplacement des animaux n'ont pas toujours pu être obtenues. L'échantillonnage n'ayant pas été standardisé (échantillonnage individuel ou collectif en fonction des sites), nos résultats ne permettent pas, non plus, de conclure à une pression parasitaire différente entre les départements. La comparaison de la pression parasitaire ne pourrait être envisagée sans la mise en place d'études expérimentales

impliquant des groupes de chiens identiques (race, nombre, âge notamment), traités, hébergés et échantillonnés de manière similaire.

Toutefois, ces résultats donnent des informations intéressantes sur la circulation et la prévalence relative des espèces ou groupes d'espèces de tiques, notamment dans les départements du Gard, de la Drôme (Sud), de la Gironde et les deux départements de Corse, puisque dans toutes ces régions les antécédents de déplacement des animaux ont pu être obtenus. En Gironde, quatre espèces (ou genres) *I. ricinus*, *Haemaphysalis* sp., *Dermacentor* sp. et *Pholeoixodes* sp. ont été identifiés avec des prévalences de 57,1%, 25,4%, 12,9% et 4,7% respectivement. Quelques spécimens de genre *Haemaphysalis* de ce département, pour lesquels une identification plus précise a été engagée, ont pu être affiliés à l'espèce *Haemaphysalis concinna*. La prévalence élevée de tiques de l'espèce *Ixodes ricinus* et du genre *Haemaphysalis* en Gironde confirme leur présence dans le département. Leur prévalence élevée sur ces chiens peut être expliquée par le biotope particulier (forêts principalement) fréquenté par ces animaux. Les tiques des espèces *Ixodes ricinus* et *Haemaphysalis concinna* sont en effet connues pour être souvent trouvées ensemble dans les forêts fraîches en climats tempérés (Pérez-Eid, 2007).

La quasi-totalité (99%) des tiques du genre *Dermacentor* a été récoltée dans les départements de l'Ariège (09), de la Gironde (33) et des Hautes-pyrénées (65). Au sein de ce genre, deux espèces *D. reticulatus* et *D. marginatus* sont présentes dans le Sud de la France. Quelques spécimens pour lesquels une identification plus précise a été engagée, ont été affiliés à l'espèce *D. reticulatus*. Ces résultats sont confortés par la connaissance acquise sur les préférences d'hôte de chacune de ces espèces, puisque *D. reticulatus* et *D. marginatus* infestent le plus souvent les carnivores et les ongulés respectivement (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007).

Quelques tiques du genre *Pholeoixodes* (rattaché ou non selon les auteurs au genre *Ixodes* (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007) ont été récoltées sur des chiens dans les départements de l'Ariège (09), de la Gironde (33), des Hautes-Pyrénées (65) et du Rhône (69). Quelques spécimens pour lesquels une identification plus précise a été engagée, ont été affiliés à l'espèce *Pholeoixodes hexagonus*. Les tiques du genre *Pholeoixodes* sont caractérisées par leur endophilie à tous les stades (ce qui les différencie des tiques du genre *Ixodes* notamment), et c'est souvent le comportement fouisseur des carnivores qui explique les infestations (Pérez-Eid, 2007). *Pholeoixodes hexagonus* est une espèce largement distribuée en Europe (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2007).

Enfin, il est intéressant de constater que dans les départements où la prévalence d'infestation par des tiques *R.* du groupe « *sanguineus* » était la plus élevée, aucune tique du genre *Dermacentor* n'a été récoltée sur des chiens au cours de la période de suivi.

2.5. Conclusion

Les résultats obtenus permettent de compléter les connaissances sur la nature et la distribution des espèces de tiques présentes dans le Sud de la France. Ces informations sont essentielles à la mise à jour des cartes de distribution des espèces de tiques dans cette région. Le protocole d'échantillonnage mis en place au cours de cette étude préliminaire a permis de sélectionner trois régions d'intérêts, Le Gard, le Sud de la Drôme et la Corse pour l'analyse des agents pathogènes chez les chiens et les tiques

R. sanguineus (Figure 20). La distance géographique entre ces départements et le statut probablement « indemne de babésiose » de la Corse ont incité à poursuivre l'étude dans ces trois régions.

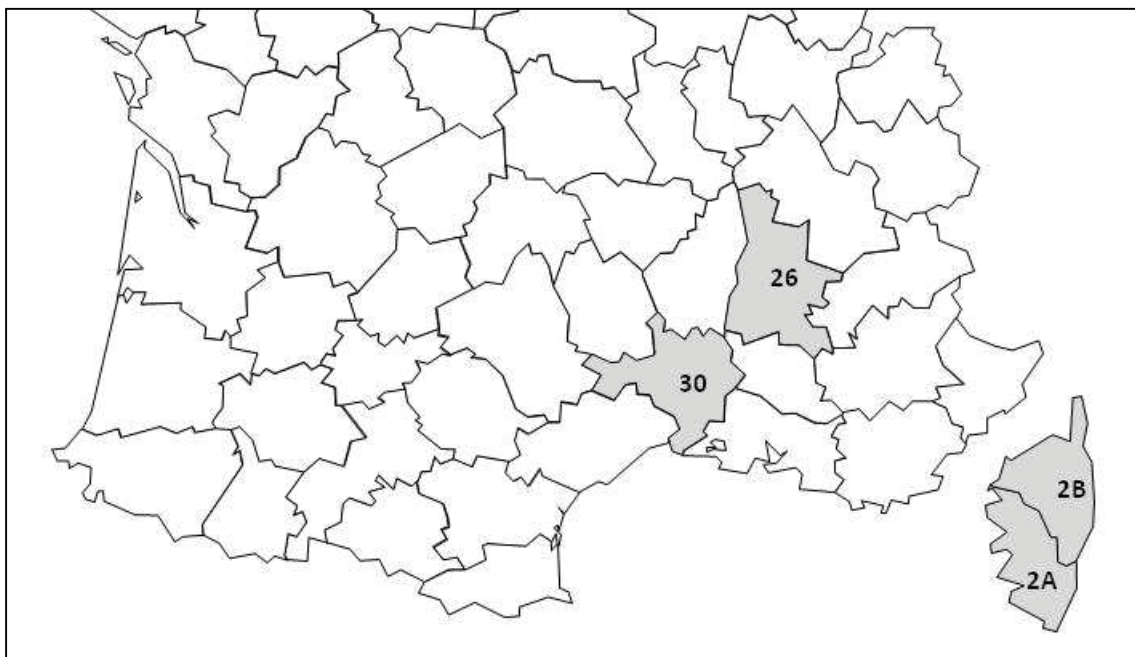


Figure 20 : Départements sélectionnés pour la recherche des agents pathogènes chez les hôtes et les vecteurs.

Chapitre 2 : Etude du portage en protozoaires de l'espèce *Babesia vogeli* chez les chiens et les tiques *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dans la région de Sommières (Gard, France)

1. Introduction

Les enquêtes décrites dans le premier chapitre de ce travail ont permis (i) de justifier de l'intérêt de poursuivre l'étude de la babésiose canine dans le bassin méditerranéen français et (ii) d'identifier dès la fin de l'été 2010 trois régions d'intérêt (le Sud de la Drôme, le Gard et la Corse) pour la recherche des agents pathogènes transmis aux chiens par les tiques *R. sanguineus*. *R. sanguineus* est le vecteur de *Babesia vogeli* dans de nombreux pays du monde, et notamment en régions tropicales et méditerranéennes où les conditions climatiques sont particulièrement favorables à son développement (Irwin, 2010; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Elle pourrait également jouer un rôle dans la transmission de *B. gibsoni* (Dantas-Torres, 2008) et de *B. canis* (Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010).

En Europe, *B. canis* est l'espèce la plus souvent incriminée dans l'apparition de cas de babésioses canines. Son principal vecteur est *Dermacentor reticulatus*. *B. vogeli* a été détectée dans plusieurs pays du bassin méditerranéen dont l'Italie, l'Espagne, le Portugal, l'Albanie, la Slovénie, la Croatie, la Turquie, la Tunisie et l'Egypte (Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; Criado-Fornelio et al., 2007; Duh et al., 2004; Gülanber et al., 2006; Hamel et al., 2009; M'ghirbi et Bouattour, 2008; Solano-Gallego et al., 2008; Uilenberg et al., 1989). Les descriptions d'infections par *B. gibsoni* sont, quant-à-elles, plus sporadiques (Solano-Gallego et Baneth, 2011).

En France, la babésiose canine est une maladie fréquente (Bourdoiseau, 2006). Toutefois, la caractérisation moléculaire des protozoaires responsables n'a été que rarement réalisée. *Babesia canis* est considérée comme l'agent principal de la maladie sur une grande partie du territoire métropolitain. Malgré une présence soutenue de *R. sanguineus* dans le Sud de la France, en particulier dans le bassin méditerranéen, *B. vogeli* n'a été mise en évidence qu'une seule fois en France, en 2002, chez un chien originaire d'Italie qui aurait acquis le protozoaire dans la région de Nantes (Cacciò et al., 2002). *B. vogeli* a, en outre, été détectée par PCR dans des tiques *R. sanguineus* au cours de deux enquêtes conduites entre 2001 et 2004 dans différents départements du Sud et du Centre de la France (Beugnet et Marié, 2009).

L'objectif de la deuxième partie de ce travail a été de caractériser les espèces de piroplasmes infectant les chiens et les tiques *R. sanguineus* dans une zone où la pression d'infestation par *R. sanguineus* était importante. La région de Sommières (département du Gard) a été choisie pour répondre à cet objectif. En effet, cette région était caractérisée par une présence soutenue des tiques *R. sanguineus* sur les chiens et les vétérinaires y rapportaient l'observation régulière de cas de babésioses canines. La mise au point d'une méthode de détection sensible et spécifique pour la détection des *B. vogeli* dans les

échantillons de sang de chiens et les vecteurs a été entreprise afin de répondre à cet objectif. Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication parue en 2012 dans la revue Veterinary Parasitology.

2. Publication n°2 : “First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France”



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France

M. René^a, J. Chêne^a, J.P. Beaufls^b, C. Valiente Moro^c, G. Bourdoiseau^a, P. Mavingui^c, L. Chabanne^{a,*}

^a Université de Lyon, VetAgro Sup, Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés, F-69280 Marcy l'Etoile, France

^b Clinique Vétérinaire de Sommières, Villevieille, France

^c Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5557, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, F-69622 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2011

Received in revised form 16 January 2012

Accepted 23 January 2012

Keywords:

Babesia vogeli

Rhipicephalus sanguineus

Dogs

Molecular identification

Phylogeny

ABSTRACT

Babesiosis is an emerging tick-borne disease of animals and humans caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria*. In France canine babesiosis has a high prevalence with *Babesia canis* thought to be the main aetiological agent of the disease. *Babesia vogeli* has already been reported to occur in Europe and in other countries around the Mediterranean Sea. The tick *Rhipicephalus sanguineus*, the main known vector of *B. vogeli*, occurs in southern France. However, only one case of a *B. vogeli* infected dog has been reported to date in France. To gain further insight into the prevalence of *Babesia* and *Theileria* infections in dogs and ticks of the *R. sanguineus* complex, a study was conducted in a veterinary practice in the south of France from January to September 2010. Twelve bloods from dogs and 36 *R. sanguineus* ticks were analyzed using PCR and sequencing. For the analysis of ticks, a new primer was designed to specifically amplify the *B. vogeli* 18S rRNA gene. Four dogs (33.3%) and 8 ticks (22.2%) were found to be infected with *B. vogeli*.

This approach has thus revealed for the first time a cluster of cases of canine babesiosis caused by *B. vogeli* in France and highlights the need to systematically screen for pathogens potentially responsible for canine babesiosis at the species level using suitable molecular tools.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease of animals and humans caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* (Irwin, 2009; Vannier and Krause, 2009). In dogs, infection by these parasites usually induces a syndrome characterized by hyperthermia and anaemia that can be fatal when complicated (Irwin, 2009). Historically, the taxonomic identification of *Babesia* species was based on morpho-

logical characteristics of the intraerythrocytic forms with species classified as small (1–2.5 µm) or large (2.5–5 µm) (Solano-Gallego and Baneth, 2011). Accordingly, *Babesia canis* (large *Babesia*) and *Babesia gibsoni* (small *Babesia*) were long thought to be the only species that provoke canine babesiosis in the world (Boozer and Macintire, 2003). However, based on differences in antigenic properties, geographical distribution and vector specificity, it was proposed that *B. canis* could be divided into three subspecies: *Babesia canis canis* transmitted by *Dermacentor reticulatus*; *Babesia canis vogeli* transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*; and *Babesia canis rossi* transmitted by *Heamaphysalis laechei* (Uilenberg et al., 1989; Hauschild et al., 1995). More recently, genotyping has confirmed

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 87 26 12; fax: +33 4 78 87 26 17.
E-mail address: luc.chabanne@vetagro-sup.fr (L. Chabanne).

the existence of three separate species (Zahler et al., 1998) now called *Babesia canis*, *Babesia vogeli* and *Babesia rossi* (Uilenberg, 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011) and has allowed the characterization of new species belonging to the genera *Babesia* or *Theileria* also capable of infecting dogs (Solano-Gallego and Baneth, 2011). *B. canis* is commonly found in temperate regions of Europe, *B. vogeli* has a global distribution similar to that of its vector *R. sanguineus* throughout tropical, subtropical and Mediterranean areas, and *B. rossi* is thought to be restricted to Africa (Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011).

Canine babesiosis has a high prevalence in France (Bourdoiseau, 2006) and *B. canis* is considered as the main species involved in the disease cases (Bourdoiseau, 2006; Beugnet and Mari  , 2009; Fritz, 2010). However, dogs infected with *B. vogeli* have been reported in European countries and other countries around the Mediterranean sea including Italy, Spain, Portugal, Albania, Slovenia, Croatia, Turkey, Tunisia and Egypt (Uilenberg et al., 1989; Duh et al., 2004; Gülanber et al., 2006; Criado-Fornelio et al., 2007; Cardoso et al., 2008; M'ghirbi and Bouattour, 2008; Solano-Gallego et al., 2008; Beck et al., 2009; Hamel et al., 2009). The only report of a *B. vogeli* dog infection in metropolitan France was in a dog originating from Italy, which may have acquired the infection during a stay in an area close to Nantes in the northwest of France (Cacci   et al., 2002).

Recently, two epidemiological surveys carried out in 2001–2002 and 2003–2004 reported the molecular identification of *B. vogeli* in *R. sanguineus* ticks found in different parts of France (Beugnet and Mari  , 2009). Although *R. sanguineus*, sometimes infected with *B. vogeli*, is known to occur in the south of France (Bourdoiseau, 2006; Beugnet and Mari  , 2009), subsequent surveys have not detected the protozoan parasite in dogs (Criado-Fornelio et al., 2009; Fritz, 2010).

To gain further insight into the prevalence of *Babesia* and *Theileria* infections in dogs and ticks of the *R. sanguineus* complex in the south of France, an epidemiological survey was initiated in an area where *R. sanguineus* is well established. Sampling and molecular analysis methods were designed to better screen for *B. vogeli*.

2. Materials and methods

2.1. Epidemiological records and dogs selection

From January to September 2010, all dogs with clinical signs suggestive of canine babesiosis and/or carriers of ticks presented in a veterinary practice in Sommières (Gard, France) were included in the survey. A questionnaire was submitted to the dog owners in order to obtain general information in particular on the travel history of the dog in the weeks before samples were taken.

2.2. Handling of blood samples

2.2.1. Sample collection and DNA extraction

Venous blood samples were obtained from the cephalic or the jugular veins of dogs using blood collection tubes

with anticoagulants (EDTA for subsequent hematological or molecular analyses; lithium-heparin for biochemical analyses). A blood smear was systematically done extemporaneously with fresh or whole blood in EDTA. In some cases, hematological and/or biochemical analyses were done immediately after blood sampling using VetAutoreadTM (IDEXX laboratories, Westbrook, USA) and/or VetTest^{  } (IDEXX laboratories, Westbrook, USA) analyzers respectively according to the manufacturer's instructions. Blood smears were air dried and stored at room temperature whereas blood samples in collection tubes were stored at 5 ± 1   C until DNA extraction (within 5 days after collection). Blood smears were stained using the May Grünwald Giemsa method and observed by light microscopy. To extract DNA, samples were pre-treated to avoid potential PCR inhibition by haemoglobin as follows. A total of 500   l of whole blood in EDTA was mixed with 1 ml sterile water, then samples were vortexed and centrifuged at 10,000 rpm for 3 min. Cell pellets were washed by resuspending in 1 ml of PBS followed by centrifugation as before. The resulting cell pellets were resuspended in PBS to a final volume of 200   l. DNA was extracted using a commercial DNA extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit^{  }) according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany).

2.2.2. DNA amplification

An initial PCR amplification was performed from each DNA blood sample to confirm the presence of dog DNA and the absence of PCR inhibition. PCR was carried out in a thermocycler (Biometra^{  } T gradient, Goettingen, Germany) by using CAN-F and CAN-R primers (Table 1) that specifically amplify a 290-bp fragment of the mitotoxin gene of *Canis familiaris*, as previously described (Criado-Fornelio et al., 2003). All blood DNA samples were then analyzed by PCR diagnostic of both *Babesia* and *Theileria* using primers Ba103F and Ba721R (Table 1). This set of primers amplifies a fragment of about 620-bp of the 18S rRNA gene of *Babesia* or *Theileria* spp. (Kledmanee et al., 2009). The amplification reaction was carried out in a total of 25   l containing 300   M (each) deoxyribonucleotide, 0.625 U of Hotstartaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) and 12.5 pmol of each primer in the reaction buffer provided by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). The following conditions were used: 95   C for 15 min; 30 cycles at 94   C for 45 s, 65   C for 45 s and 72   C for 1 min 30 s; and 72   C for 10 min. Suitable positive (*B. vogeli* DNA obtained from MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) and negative controls (reaction mix without DNA) were systematically included in parallel. An aliquot (6   l) of each amplified product was separated on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide at 130 V for 1 h and the bands were visualized under ultraviolet illumination.

2.3. Handling of tick samples

2.3.1. Sample collection and DNA extraction

Ticks found on dogs were carefully detached from their host without damaging the rostrum and stored in 70% ethanol. Ticks were identified under light microscopy using morphological identification keys (Estrada-Peña et al.,

2004; Pérez-Eid, 2007). In case of dogs with low ticks infestation, all the ticks retrieved from the dogs were submitted to DNA extraction. In cases of heavy infestation, adult female ticks were preferentially selected (Table 2). Each tick was washed three times in PBS, then once in 70% ethanol for 5 min and 3 more times in PBS. Small pieces were cut from the tick using a disposable scalpel under a sterile laminar flow hood. DNA was extracted from the tissue using the QIAamp DNA Mini Tissue extraction kit® (Qiagen, Hilden, Germany). Briefly, each sample was covered in the tissue lysis buffer included in the kit (between 180 µl and 540 µl depending on the size of the tick) and treated with proteinase K (20 µl per 180 µl of tissue lysis buffer) overnight at 56 °C. Subsequent steps were carried out according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany).

2.3.2. Primer design and DNA amplification

For the analysis of tick infection status, the quality of the extracted DNA (presence of tick DNA and absence of PCR inhibition) was first checked by PCR amplification using specific primers TQ16S + 1F and TQ16S-2R (Table 1) that generate a 320-bp fragment of the tick mitochondrial 16S rRNA gene (Black and Piesman, 1994). Subsequent sequencing of selected samples was done to confirm the previous morphological identification of the ticks.

By aligning 10 sequences of the 18S rRNA gene of *Babesia* and *Theileria* spp. (accession numbers AF205636, L19079, AY072926, AY072925, HM590440, Z15104, AY618928, Z15105, U09833, AF188001) using Bioedit v7.0.5.3 (Hall, 1999) software, a region of the 18S rRNA gene specific to *B. vogeli* was identified. A forward primer named BCV-F (Table 1) was designed to specifically target this region. Thus to screen for the presence of *B. vogeli*, the BCV-F primer was used with the reverse primer Ba721R (Table 1) yielding a 422-bp fragment in two successive amplifications using similar conditions (mix composition and PCR cycles) as for the detection of *Babesia/Theileria*. Specificity of the novel species-specific PCR was tested against the genomic DNA extracted from blood known to be infected with different *Babesia* and *Theileria* species, including *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. rossi*, *B. vogeli*, *Theileria annae* and *Theileria equi*, with *Canis familiaris* DNA used as a negative control.

2.4. Sequencing and phylogenetic analysis

The PCR products amplified from blood and tick samples were sequenced at BIOFIDAL-DTAMB (FR BioEnvironment

and Health, Lyon, France). Sequences obtained were manually corrected by visual analysis of the electropherogram using Bioedit v7.0.5.3 (Hall, 1999) then used as query sequences using BLAST against the NCBI nucleotide database. To construct phylogenetic trees, sequences were aligned with those of *B. vogeli*, *B. canis*, *B. rossi*, *B. gibsoni*, *Babesia odocoilei*, *Babesia divergens*, *T. equi*, *Babesia microti*, *T. annae* (also called *Babesia* sp. "Spanish dog" or *Babesia microti*-like), and *Toxoplasma gondii* retrieved from Genbank®. Phylogenetic analyses were performed with the Seaview software (Gouy et al., 2010) using the Hasegawa, Kishino and Yano (HKY) maximum likelihood method, the Kimura's two-parameter (K2P) distance method and the parsimony method with branch supports estimated by bootstrapping with 1000 replicates.

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

Sequences of *B. vogeli* were submitted to Genbank® under accession numbers from JN713120 to JN713123 for sequences from dog blood samples and from JN713124 to JN713131 for sequences from ticks. Mitochondrial 16S rRNA gene partial sequences from ticks were submitted to Genbank® under accession numbers from JQ362399 to JQ362409.

3. Results

3.1. Specificity of BCV-F primer

PCR amplification of *Babesia* and *Theileria* species with the newly designed primer BCV-F used in combination with a genera-specific primer Ba721R yielded a band of the expected size (~422 bp) with DNA from *B. vogeli*. No amplification product was observed with other DNA templates, indicating species-specific amplification (Fig. 1). Sequencing and BLAST analyses of the amplified products confirmed that they belonged to *B. vogeli*.

3.2. Canine babesiosis case reports

The survey resulted in the selection of 12 dogs that were investigated further. Four out of these 12 dogs (33.3%) had clinical signs compatible with canine babesiosis (Table 3). These four dogs were numbered dog#2, dog#3, dog#4 and dog#10. For dogs#2, #3 and #4, diagnosis of canine babesiosis was confirmed after examining blood smears

Table 1
Primers used in this study.

Gene target	PCR genus or species target		Fragment length	Reference
Mitosis gene	<i>Canis familiaris</i>	CAN-F CAN-R	5'-CTTGTACGCGTAAGGTTTC-3' 5'-CTGATGTATTTCTGCACCAAG-3'	290-bp Criado-Fornelio et al. (2003)
18s rRNA gene	<i>Babesia/Theileria</i> spp.	Ba103F Ba721R	5'-CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACA-3' 5'-CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTCTCTCAAG-3'	620-bp Kledmanee et al. (2009)
18s rRNA gene	<i>Babesia vogeli</i>	BCV-F Ba721R	5'-GTGTTCCGAGTTTGCCATTCCG-3' 5'-CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTCTCTCAAG-3'	422-bp Developed in this study Kledmanee et al. (2009)
Mitochondrial 16S rRNA gene	Ixodida	TQ16S + 1F TQ16S-2R	5'-CTGCTCAATGATTTTTAAATTGCTGTGG-3' 5'-ACGCTGTTATCCCTAGAG-3'	320-bp Black and Piesman (1994)

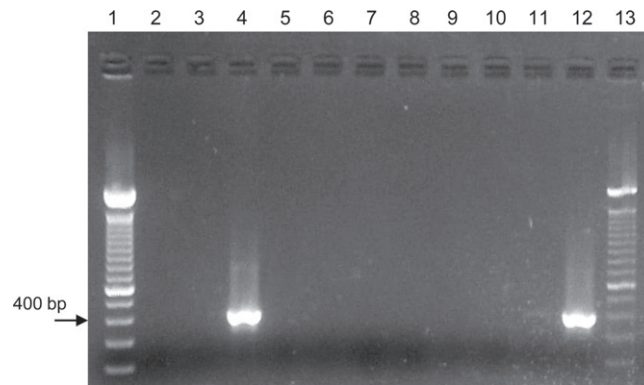


Fig. 1. Detection of *Babesia vogeli* by PCR amplification of an 18S rDNA region from *Babesia* or *Theileria* infected dog blood DNA using species-specific forward primer BCV-F developed in the study and reverse primer Ba721R. Lanes 1 and 13, 100-bp molecular markers. Lane 2, no template DNA (negative control). Lanes 3–12, PCR products from DNA samples of blood that was uninfected or infected with the protozoan species given. Lane 3, *Babesia canis*; 4, *Babesia vogeli*; 5, *Babesia rossi*; 6, *Babesia gibsoni*; 7, *Theileria annae*; 8, *Babesia caballi*; 9, *Theileria equi*; 10 and 11, uninfected dog blood; 12, *Babesia vogeli*.

that showed typical large *Babesia* forms (Fig. 2A) and by genera-specific PCR amplification signals corresponding to *Babesia/Theileria* (Fig. 2B). In contrast, no intraerythrocytic elements were observed in the blood smear of the fourth dog (dog#10) and the corresponding genera-specific PCR signal was very weak. Subsequent amplification of the dog#10 blood sample using *B. vogeli* species-specific PCR developed in this study confirmed the *Babesia* infection. Samples from the other eight dogs gave negative results in both the blood smear and PCR tests. The questionnaire answers from owners indicated that the four diseased dogs were present in the studied area throughout the two weeks prior to the first clinical examination. In addition, owners reported recent tick infestation in these dogs. Specifically dog#2 had been born in Villevieille, a village adjacent to Sommières, and had no history of travel except in the department.

The 619-bp sequences obtained from dog#2, dog#3 and dog#4 blood samples showed 100% identity to each other

and 99.7–99.8% identity with 18S rRNA gene sequences of *B. vogeli* from France (AY072925), USA (AY371198), China (HM590440), Venezuela (DQ297390), Japan (AB083374; AY077719) and Brazil (AY371194) present in Genbank^{  }. The 422-bp sequence obtained from the dog#10 blood sample was 100% identical to the equivalent *B. vogeli* sequences obtained from the other three infected dogs and the Genbank^{  } sequences previously listed.

3.3. Ticks identifications and molecular analyses

A total of 83 adult ticks (34 male and 49 female) was collected from the 12 dogs studied. All the ticks collected were identified as belonging to the complex of species *R. sanguineus* using morphological key characteristics. DNA was extracted from 36 ticks and then analyzed by PCR.

A tick mitochondrial 16S rRNA gene fragment was amplified and sequenced from 11 out of the 36 selected ticks. BLAST analyses of mitochondrial 16S rRNA gene

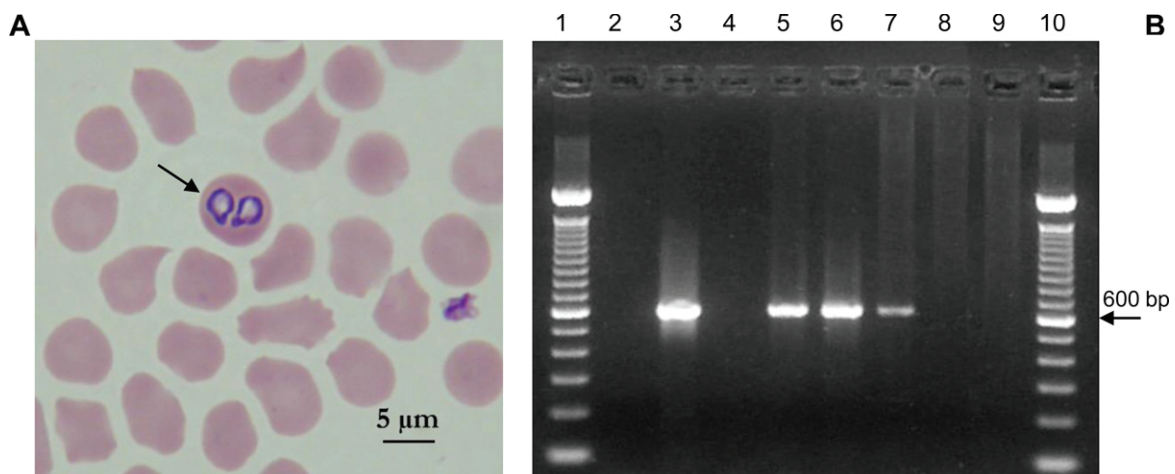


Fig. 2. Parasite detection by Giemsa staining and PCR amplification. (A) Photomicrograph (magnification 100  ) of a Giemsa-stained thin smear of blood from dog#2 showing erythrocytes parasitized by large *Babesia*. Blood from this dog was found to contain *Babesia vogeli* by molecular analysis. (B) *Babesia/Theileria* genera-specific PCR analysis of the amplification products of the 18S rDNA small subunit from selected blood samples. Lanes 1 and 10, 100-bp molecular markers; Lane 2, no template (negative control); Lanes 3–9, PCR products from blood DNA template as follows: Lane 3, *Babesia canis* DNA; Lane 4, dog#1 sample; Lane 5, dog#2 sample; Lane 6, dog#3 sample; Lane 7, dog#4 sample; Lane 8, dog#5 sample; Lane 9, dog#12 sample.

Table 2

Summary of PCR analysis of DNA extracted from dog bloods and ticks.

Dogs ^a			Ticks (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>) ^b			Tick No. ^c	Babesia vogeli sequence	Genbank accession numbers
Dog No.	PCR results	Genbank accession numbers	N collected	N analyzed	N PCR positive			
# 1	–		45 (19M; 26F)	14 (2M; 12F)	2F	Dog#1.T28; dog#1.T29	2; 1	JN713124; JN713125
# 2	+	JN713120	2 (2F)	2 (2F)	1F	Dog#2.T1	1	JN713126
# 3	+	JN713121	1 (1F)	1 (1F)	0			
# 4	+	JN713122	1 (1F)	1 (1F)	0			
# 5	–		16 (12M; 4F)	4 (4F)	2F	Dog#5.T1; dog#5.T2	2; 1	JN713127; JN713128
# 6	–		0	0	0			
# 7	–		1 (1F)	1 (1F)	0			
# 8	–		1 (1F)	1 (1F)	0			
# 9	–		14 (3M; 11F)	10 (1M; 9F)	2F	Dog#9.T9; dog#9.T14	2; 2	JN713129; JN713130
# 10	+	JN713123	0	0	0			
# 11	–		1 (1F)	1 (1F)	0			
# 12	–		1 (1F)	1 (1F)	1F	Dog#12.T1	1	JN713131

Bold type indicates cases of confirmed infection.

M, male ticks; F, female ticks; N, number of samples; –, no amplicon detected; +, specific amplicon detected.

^a Dog blood DNA was analyzed using *Babesia/Theileria* genera-specific PCR.^b Tick DNA was analyzed using *B. vogeli* species-specific PCR.^c Dog#1.T28 corresponds to the tick no. 28 collected on dog#1.

sequences confirmed their affiliation to *R. sanguineus* with 97.5% to 98.1% identity with *R. sanguineus* from Oklahoma (AF081829, Black and Roehrdanz, 1998).

Species-specific PCR and sequencing of the *B. vogeli* 18S rRNA gene fragment from tick DNA samples showed that eight out of 36 ticks (22.2%) were infected with *B. vogeli* (Fig. 3). Sequence analysis of the 18S rDNA PCR products revealed the existence of two *B. vogeli* sequences. The first

sequence (sequence 1) was identified in four ticks and was 100% identical to sequences obtained from dog blood samples in the present study. The second sequence (sequence 2) was identified in four ticks and differed by one transition at position 27 (T in sequence 1, C in sequence 2); this sequence 2 was 100% identical to that of *B. vogeli* from Egypt (AY371197). The results of the analyses of dog and tick DNA are summarized in Table 2.

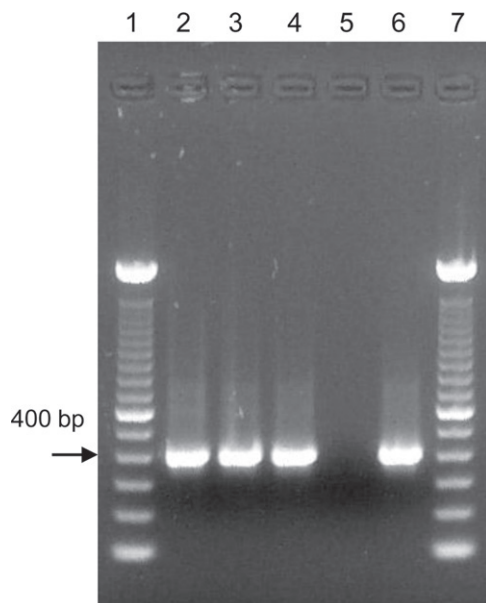


Fig. 3. Detection of *Babesia vogeli* by PCR amplification of an 18S rDNA region from selected tick DNA samples using species-specific forward primer BCV-F developed in the study and reverse primer Ba721R. Lanes 1 and 7, 100-bp molecular markers; Lane 2, dog#1.T28 tick DNA; Lane 3, dog#5.T1 tick DNA; Lane 4, dog#9.T14 tick DNA; Lane 5, no DNA; 6, *Babesia vogeli* DNA. For sample identification refer to Table 2.

3.4. Phylogenetic analysis of *B. vogeli*

The 619-bp sequence of *B. vogeli* obtained from dog#2 blood sample (JN713120) was aligned with sequences retrieved from Genbank®. A phylogenetic tree was built using the Hasegawa, Kishino and Yano maximum likelihood method (Fig. 4). The resulting tree placed the *B. vogeli* sequence (JN713120) among *Babesia* and *Theileria* species and identified two well-defined groups with a strong support value. One group consisted exclusively of *Babesia* species (97% bootstrap value). Within this group all *B. vogeli* specimens formed a subgroup (100% bootstrap value) where sequence JN713120 from our study and sequences of *B. vogeli* isolated from different parts of the world formed a cluster. The other group clustered sequences of two *Theileria* species and *Babesia microti* (75% bootstrap value).

4. Discussion

To date, there have been few studies of canine babesiosis in France associating an accurate molecular identification of the parasite and a sufficient number of cases, so little is known of the prevalence of the disease caused by *B. vogeli*. *B. vogeli* was first detected in France from an Italian dog that may have acquired the infection while staying in an area close to Nantes (Cacciò et al., 2002).

Table 3
Clinicopathological data of sick dogs infected with *Babesia vogeli*.

Dogs signalment			Epidemiological background	Clinical signs; hematological or biochemical data	Predisposing factors/concomitant disease	Therapy	Follow up	
Dog No.	Breed	Sex						
# 2	Border collie	Female	1	Living in Villeveuille (Gard, France). Born in Villeveuille. No travel history since birth. Occurrence: 24 April 2010	Lethargy and anorexia for 2 days. Hyperthermia (39.9 °C). Blood smear examination: typical large <i>Babesia</i> and monocytosis. CBC not done. Urea, creatinine and protein were normal.	None	1 injection imidocarb (6 mg/kg) + 1 injection dexamethazone	Good: improvement in 24 h
# 3	Australian shepherd	Male	9	Passing through Sommières (Gard, France) for 13 days. Coming from Switzerland via Lozère (France). Occurrence: 27 April 2010	Lethargy for few hours. Hyperthermia (39.9 °C). Blood smear examination: typical large <i>Babesia</i> and monocytosis. CBC not done. Urea, creatinine and protein were normal.	None	1 injection imidocarb (6 mg/kg) + 1 injection dexamethasone	Not known
# 4	Rottweiler	Female	9	Living in Boissières (Gard, France). No travel history for 15 days before examination. Travel history before not known. Occurrence: 17 May 2010	Hyperthermia (39.5 °C), anorexia, weight loss for 2 months. Blood smear examination: typical large <i>Babesia</i> . CBC not done. Urea, creatinine, protein, glucose, ALT and ALP were normal.	Hepatosplenic tumor	1 injection imidocarb (6 mg/kg) + 1 injection dexamethasone + doxycycline 10 mg/kg/d (7 days)	Improvement in 24 h then anorexia and hyperthermia again 5 days later. Echography evidenced an hepatosplenic tumor. 16 August 2010: euthanasia.
# 10	German Shepherd cross	Male	3	Living in Saint-Sébastien d'Aigrefeuille (Gard, France). No travel history for 15 days before examination. No travel history out of France since 2 months old (travel history before not known). Occasional journeys out of the department in southern France. Occurrence: 02 July 2010	Hyperthermia (40.2 °C). Blood smear examination: no intraerythrocytic elements were observed. CBC showed mild leukocytosis. Urea, creatinine, protein, glucose, ALT were normal. ALP were slightly increased.	None	02 July 2010: enrofloxacin + (amoxicillin and clavulanic acid), 05 July 2010, because of persistence of hyperthermia: 1 injection imidocarb + doxycycline	Good: improvement in 24 h after second examination

CBC: Complete Blood Count; ALT: Alanine Transaminase; ALP: Alkaline Phosphatase.

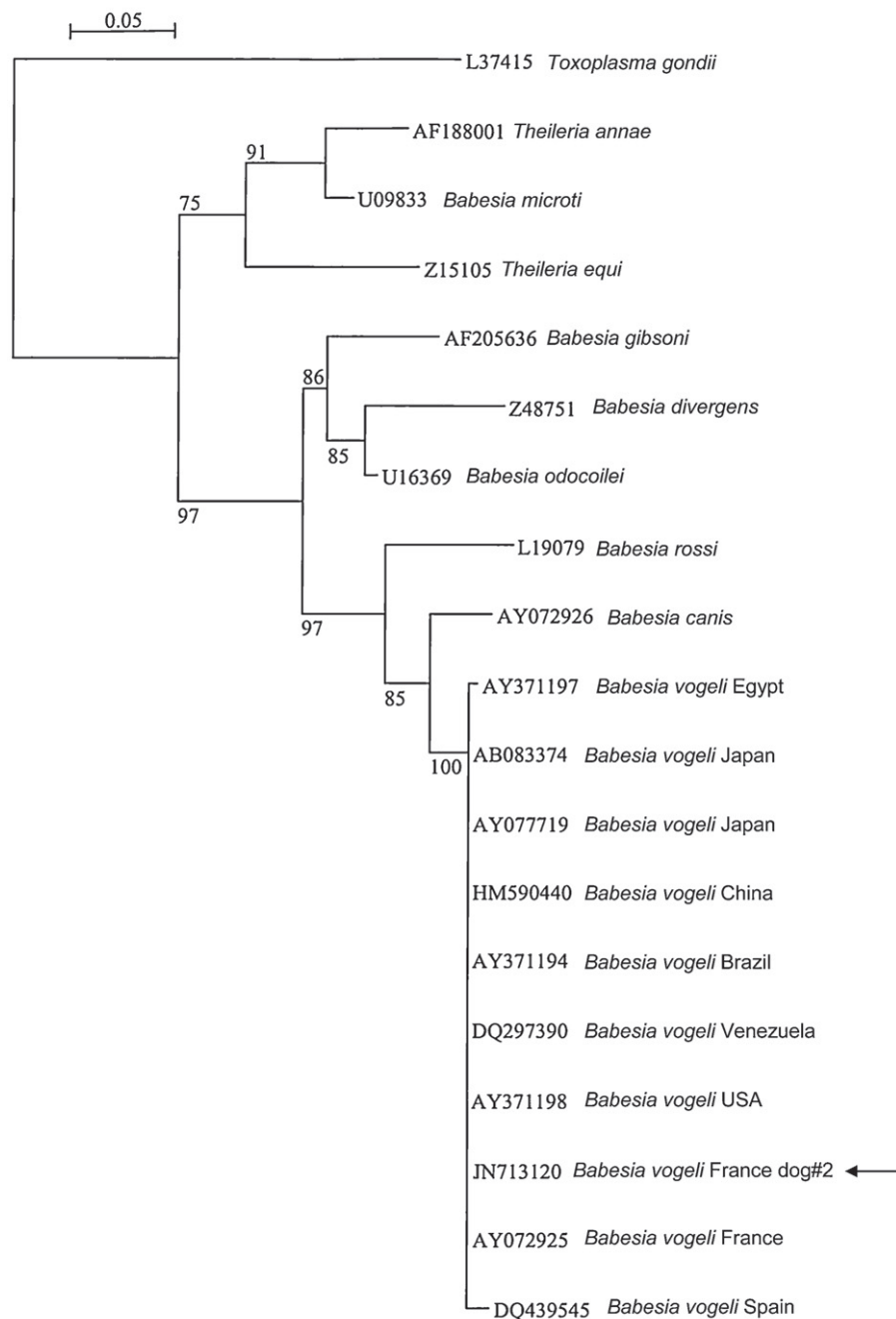


Fig. 4. Phylogenetic analysis based on 619-bp of 18S rRNA gene sequences of *Babesia vogeli* obtained from the naturally infected dog#2 and sequences of several *Babesia/Theileria* species from Genbank®. Identity and Genbank® accession numbers are indicated for each sample. For *Babesia vogeli* samples, the country where the sample was isolated or where the infection had occurred is also given. The phylogenetic tree was constructed using the Hasegawa, Kishino and Yano maximum likelihood method, with bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 75\%$. The tree was rooted using *Toxoplasma gondii* as an outgroup. Subsequent analyses using the Kimura's two-parameter (K2P) distance method and the parsimony method in the same conditions confirmed the topology of the tree.

From an epidemiological point of view, this first molecular identification of *B. vogeli* in France is open to debate as the case was recorded in a region of the north-west of France where *R. sanguineus*, the known vector of *B. vogeli*, is scarce. In France, this tick species is mostly present

in the Mediterranean region where climatic conditions are more suited for its establishment. Infections of dogs with *B. vogeli* in central and southern Italy have been demonstrated however (Solano-Gallego et al., 2008). Asymptomatic carriage has also been demonstrated with

this species (Beck et al., 2009; Hamel et al., 2009), so we cannot exclude the possibility that the dog infection with *B. vogeli* reported by Cacciò et al. (2002) occurred in Italy.

From December 2006 to July 2007, Criado-Fornelio et al. (2009) analyzed blood from 108 dogs from France (50% of which were from the south of France) by PCR amplification and sequencing. None of these dogs were found to be infected with *B. vogeli*, except one dog infected in the Reunion Island (Indian Ocean). Similarly, from March 2006 to March 2008, Fritz (2010) analyzed blood from 166 dogs mainly from the northern half of France by PCR-RFLP and sequencing. No evidence of *B. vogeli* infection was found.

In the present study, the occurrence of canine babesiosis was investigated in an area surrounding a veterinary practice in the South of France. Four dogs out of 12 tested (33.3%) were found to be infected with *B. vogeli*. A possible explanation for such positive results compared with previous negative data is the method of selecting dog candidates. We focused on an area where *R. sanguineus* is the main tick species found on dogs and selected dogs that had clinical signs suggestive of canine babesiosis or that were infested with ticks. For one dog, precise data were obtained ascertaining that the infection had been contracted locally as the dog was born in the region and had not traveled except in the department. For the other three dogs, the owners recorded recent tick infestation, which supports the hypothesis that the infection might have been contracted in this region of France. The four cases occurred close together in time and space and were concomitant with the detection of a relatively high number of *B. vogeli* infected ticks. This suggests there might have a hot-spot of infection in dogs and ticks around this area at the time of the study.

B. vogeli is generally thought to be the least pathogenic of the well-recognized canine piroplasm species, causing subclinical, mild or moderate symptoms in adult dogs (Bourdoiseau, 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011). In addition, asymptomatic carriage has been demonstrated (Beck et al., 2009; Hamel et al., 2009). For the four infected dogs in the present study, symptomatic and clinicopathological data, albeit incomplete, included fever ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) and lethargy without known complications, described by the veterinarian as an “acute form of babesiosis”. However, some biochemical and hematological data are lacking and further studies must be conducted to clarify the course of such infections. Only dog#4 had a known predisposing factor (concomitant hepatosplenic tumor) and was later euthanized. It is also important to note that *R. sanguineus*, the only tick species found in this study, can transmit other pathogens like *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* to dogs through bites or vector ingestion. With the development of molecular tools, co-infections are more likely to be demonstrated, adding to the complexity of clinical diagnosis (de Caprariis et al., 2011). As these other pathogens were not targeted in our study, it is not possible to attribute with absolute certainty the observed clinical signs to *B. vogeli* infection alone.

In this study, DNA of *B. vogeli* was found in the blood of 4 dogs and in 8 ticks belonging to the *R. sanguineus*

complex. The sequences obtained from the 4 PCR positive dogs were all identical to each other with a strong similarity to previous isolates from France (AY072925) and from the USA (AY371198). Only one dog (dog#2) was found to be simultaneously infected with *B. vogeli* and carrying an infected tick. This observation does not allow us to conclude which of the host or the tick contaminated the other since the tick was already partially engorged when it was detached from its host. Seven out of the eight *Babesia*-infected ticks were collected from uninfected dogs. Pathophysiologically speaking, these observations are not surprising since it has been shown that infection with some species of *Babesia* can occur 2–3 days after tick attachment (Schein et al., 1979). However, the identification of *B. vogeli* DNA in dogs and ticks in the same geographical area and the coincidence between tick activity and the occurrence of canine babesiosis cases can support the hypothesis that *R. sanguineus* acts as a vector of *B. vogeli* in this area.

In conclusion, this survey of both dogs and ticks conducted from January to September 2010 provides new information on pathogens potentially responsible for canine babesiosis in the south of France. For the first time a cluster of cases of canine babesiosis has been related to *B. vogeli* in France. The development of a new primer specific to *B. vogeli* represents a valuable tool for future epidemiological studies. To confirm the existence of a hotspot of *B. vogeli* infection in the studied area, it will be necessary to increase the number of cases by analyzing all suspect cases in the future. This information will be of importance to establish if different strains of *B. vogeli* are present in populations of dogs and ticks in France. The vector competence of *R. sanguineus* species should also be analyzed by experimental models. Results obtained in this study indicate the need to (i) systematically screen for possible pathogens responsible for canine babesiosis at the species level using molecular tools and (ii) to improve knowledge of the clinical course of single infections using different strains of *B. vogeli* and co-infections with other tick-borne pathogens. This will enhance our knowledge of the efficacy of treatments and vaccines currently available in France.

Conflict of interest statement

None of the authors have any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by Merial (Lyon, France) and Centre National de la Recherche Scientifique (France). We sincerely thank Pr Theo Schetters (MSD Animal Health, Boxmeer, Netherlands), Pr K. Pfister (Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, University of Munich, Germany) and Dr A. T. Camacho Garcia (Vigo, Spain) for providing *Babesia* and *Theileria* samples.

References

- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivcinkjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* 39, 843–848.
- Beugnet, F., Marié, J.L., 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298–305.
- Black, W.C., Piesman, J., 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (*Acari: Ixodida*) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10034–10038.
- Boozer, A.L., Macintire, D.K., 2003. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 885–904.
- Black 4th, W.C., Roehrdanz, R.L., 1998. Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1772–1785.
- Bourdoiseau, G., 2006. Canine babesiosis in France. *Vet. Parasitol.* 138, 118–125.
- Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 285–292.
- de Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E.B., Otranto, D., 2011. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet. Microbiol.* 149, 206–212.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156, 199–204.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189–201.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R., Irwin, P., 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasitol.* 144, 261–269.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73–76.
- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strasek, K., Avsic-Zupanc, T., 2004. Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35, 363–368.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza, 131 pp.
- Fritz, D., 2010. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol. Res.* 106, 1339–1342.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Gülanber, A., Gorenflot, A., Schetters, T.P.M., Carcy, B., 2006. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet. Parasitol.* 139, 224–230.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S., Pfister, K., 2009. Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121 (Suppl. 3), 42–45.
- Hauschild, S., Shayan, P., Schein, E., 1995. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. *Parasitol. Res.* 81, 638–642.
- Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2 (Suppl. 1), S4.
- Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Saksai, P., Suwannachai, P., Sariya, L., Buddhirongawatr, R., Charoonrut, P., Chaichoun, K., 2009. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40, 35–39.
- M'ghirbi, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152, 1–7.
- Pérez-Eid, C., 2007. Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Editions TEC&DOC/Editions Médicales Internationales, Paris/Cachan, 314 pp.
- Schein, E., Mehlhorn, H., Voigt, W.P., 1979. Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Trop.* 36, 229–241.
- Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.* 181, 48–60.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157, 211–221.
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia* – a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.
- Uilenberg, G., Franssen, F.F., Perié, N.M., Spanjer, A.A., 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11, 33–40.
- Vannier, E., Krause, P.J., 2009. Update on babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 984568.
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.* 84, 544–548.

3. Conclusion

La réalisation de l'enquête dans la région de Sommières (Gard) nous a permis de détecter pour la première fois le pathogène *Babesia vogeli* chez 4 chiens dans le Sud de la France. Les infections ont toutes été confirmées par l'analyse des séquences du gène codant l'ARNr 18S des agents pathogènes. Pour trois des quatre chiens, des formes caractéristiques de « grandes babésies » ont pu être observées dans des globules rouges infectés. Les quatre chiens porteurs de l'infection n'avaient aucun antécédent de déplacement au cours des 15 jours qui ont précédé le diagnostic de la maladie et leurs propriétaires ont tous rapporté des infestations récentes par des tiques. L'un des chiens notamment était né dans le département et n'avait aucun antécédent de déplacement en dehors du département depuis la naissance. Ces résultats ont permis de supporter l'hypothèse d'une infection locale.

Quatre-vingt trois tiques adultes ont été récoltées au cours de cette étude dont quatre sur des chiens infectés par *B. vogeli*. Toutes ont été affiliées, après identification morphologique, à l'espèce *R. sanguineus* s.l. (ou *R.* groupe « *sanguineus* »). L'identification génétique de onze d'entre-elles a été effectuée par PCR et séquençage d'un segment de l'ADNr 16S mitochondrial des tiques et a permis de confirmer leur affiliation à l'espèce *R. sanguineus* s.s. Huit tiques sur les 36 analysées par PCR ont donné un résultat positif à *B. vogeli* confirmé par séquençage. Toutes les infections de chiens et de tiques ont été détectées dans un espace de temps restreint et ont été concomitantes avec une forte pression d'infestation par les tiques *R. sanguineus*. Ces résultats supportent l'hypothèse que *R. sanguineus* puisse jouer le rôle de vecteur du pathogène *B. vogeli* pour le chien dans la région.

Enfin, cette étude a permis de mettre au point et de valider une méthode d'analyse fiable et sensible pour la détection de l'agent pathogène *B. vogeli* dans les sangs de chiens et les tiques et a contribué à l'identification, parmi nos sites sélectionnés, d'un site favorable pour l'étude conjointe de l'agent pathogène *Babesia vogeli* et du vecteur *R. sanguineus* et des interactions possibles entre les deux intervenants du système vectoriel étudié.

**Chapitre 3 : Babésioses canines dans le Sud de la France :
épidémiologie et étude conjointe de la génétique des tiques *R.*
sanguineus s.l. et du protozoaire *B. vogeli***

1. Introduction

Les travaux présentés dans les deux premiers chapitres de ce document nous ont permis : (i) de mettre en évidence trois zones d'études préférentielles dans lesquelles la pression d'infestation par les tiques *Rhipicephalus* du groupe *sanguineus* était forte et (ii) d'identifier, parmi ces 3 zones, un foyer d'infection probable des chiens et des vecteurs par le pathogène *B. vogeli* dans le département du Gard.

Dans ce nouveau chapitre, nous avons cherché à élargir notre enquête épidémiologique par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons de sang de chiens afin (1) d'estimer la nature et la prévalence des différentes espèces de piroplasmes circulant dans le Sud de la France et (2) de vérifier les informations précédemment obtenues auprès de vétérinaires rapportant la mise en évidence de cas de babésioses canines dans l'Ouest du bassin méditerranéen alors que l'Est du bassin méditerranéen et la Corse semblent indemnes de la maladie.

Pour étudier le rôle potentiel de *R. sanguineus* s.l. dans la transmission de la maladie, une recherche de la présence d'ADN de protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria* a été entreprise sur l'ADN total extrait de tiques *R. sanguineus* récoltées dans les trois régions (Gard, Sud de la Drôme et Corse) sélectionnées au début de ce travail. Une nouvelle méthode a été évaluée pour la détection et la caractérisation des principales espèces de piroplasmes susceptibles d'être détectées dans des échantillons de sang de chiens et des tiques *R. sanguineus* en Europe. Cette méthode utilise successivement (i) une PCR nichée pour la détection des genres *Babesia* et *Theileria* dont la haute sensibilité a été préalablement démontrée (Jefferies et al., 2007) et (ii) une digestion par les enzymes de restriction *TaqI* et *HinfI* sur les produits de PCR issus de la seconde amplification pour discriminer les espèces au sein de ces deux genres.

Enfin, à partir de l'analyse génétique d'un nombre représentatif de tiques *R. sanguineus*, un suivi des populations de tiques a été réalisé dans deux zones aux statuts différents vis-à-vis de la babésiose canine : (i) une zone supposée « indemne » (la Corse) et (ii) une zone dans laquelle nous avons mis en évidence une circulation du protozoaire *B. vogeli* (le Gard). Cette analyse génétique des populations de tiques a été mise en œuvre afin de mieux caractériser les tiques *R. sanguineus* présentes dans le bassin méditerranéen français mais également de tester l'hypothèse de l'existence de populations différentes de *R. sanguineus* dans le Sud de la France, populations qui pourraient présenter des capacités vectorielles différentes vis-à-vis des piroplasmes. Ces hypothèses ont été récemment soulevées par la mise en évidence au niveau mondial de deux populations distinctes de *R.*

sanguineus, l'une identifiée majoritairement en zones tempérées et méditerranéennes et l'autre en régions tropicales (Burlini et al., 2010; de Oliveira et al., 2005; Szabó et al., 2005). Cette partie est présentée sous forme de publication en préparation pour soumission à la revue Parasites & Vectors.

2. Publication n°3 : “Piroplasms of dogs and *R. sanguineus* ticks in southern France: epidemiological aspects and evolutionary perspectives”

Piroplasms of dogs and *R. sanguineus* ticks in southern France: epidemiological aspects and evolutionary perspectives

Magalie René-Martellet¹, Claire Valiente Moro², Jeanne Chêne¹, Gilles Bourdoiseau¹, Luc Chabanne¹, Patrick Mavingui²

Corresponding author : Magalie.renemartellet@vetagro-sup.fr

Abstract

Background

Canine babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease caused by protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* also called “piroplasms”. Among them, *Babesia vogeli*, *B. canis* and *B. gibsoni* are (or may be) transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Recent studies hypothesized the existence of two dissimilar populations of *R. sanguineus* throughout the world; ‘temperate’ versus ‘tropical’. In southern France, knowledge on pathogens responsible for canine babesiosis and involvement of *R. sanguineus* in the transmission of the disease is scarce. The objective of the study was to give new data on the epidemiology of the disease in this area.

Results

One hundred forty dog bloods and 667 ticks, including 588 *R. sanguineus* s.l., 33 *Dermacentor reticulatus*, 27 *Ixodes ricinus*, 17 *R. pusillus*, one *Pholeoixodes hexagonus* and one *Haemaphysalis* sp. were collected from 2010 to 2012 in southern France. Bloods and 242 *R. sanguineus* ticks were screened for the presence of piroplasms by PCR amplification of 18S rRNA gene. *B. vogeli* and *B. canis* were detected in 19/140 (13.6%) and 18/140 (12.9%) dogs and in 26/242 (10.7%) and 4/242 (1.7%) *R. sanguineus* ticks respectively. A single case of *Theileria annae* dog infection was evidenced and confirmed by sequencing. Prevalence of *B. vogeli* infection in dogs and ticks was significantly higher ($p < 0.001$ and $p < 0.02$ respectively) in Gard than in Corsica while *R. sanguineus* was the main tick species collected from dogs in both areas. Thirty six *R. sanguineus* specimens (22 from Gard and

14 from Corsica) were characterized on mitochondrial 16S and 12S and rRNA genes. Sequence analyses of ticks showed low sequence divergences (0% to 1.9%) and confirmed the affiliation of *R. sanguineus* from France with “temperate” species. Phylogenetic analyses evidenced correlations between geographical origin of *B. vogeli* and *R. sanguineus* isolates.

Conclusions

This study confirmed that *B. vogeli* infects dogs in southern France and supports the role of *R. sanguineus* as a vector for the pathogen in this area. It enhanced knowledge on *R. sanguineus* ticks by performing molecular characterization of 36 specimens from this area. Finally, our results suggest the existence of a coevolution process between *B. vogeli* and *R. sanguineus*. Further studies are needed to confirm these results and assess their possible repercussions on this pathogen transmission.

Keywords

Rhipicephalus sanguineus, *Babesia vogeli*, molecular identification, phylogeny, epidemiology.

Background

Rhipicephalus sanguineus “The brown dog tick” is one of the most widespread tick species in the world, preferentially found within latitudes 35°S and 50°N [1, 2]. It is a three-host tick species with a high specificity for the dog [2, 3]. Under temperate climates, *R. sanguineus* is mostly active from late spring to early summer while under tropical or subtropical climates it can be found throughout the year [2–4]. The taxonomic status of *R. sanguineus* remains controversial [2], and it is now admitted that *R. sanguineus* does not correspond to a single species but may constitute a complex of about 10 closely related species gathered under the name *Rhipicephalus sanguineus* group or *Rhipicephalus sanguineus* s.l. [2]. Recent studies using biological (cross-breeding), genetic and morphological criteria emitted the hypothesis of

the existence of two dissimilar populations of *Rhipicephalus sanguineus* throughout the world, with different distributions probably linked with latitude [5–7]. Due to its high host specificity *R. sanguineus* is an efficient vector of diseases to dogs. However, it can occasionally parasitize other domestic or wild hosts including rodents, rabbits, cats, wild canids, birds as well as humans [1, 2]. Thereby, *R. sanguineus* is a known vector of *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* to dogs and of *Rickettsia conorii* - the etiological agent of Mediterranean spotted fever - to human [1, 3]. It is also involved (or suspected) in the transmission of *Hepatozoon canis*, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Mycoplasma haemocanis* and *Anaplasma platys* to dogs and other *Rickettsia* species to human [8–11].

Babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease of animals and humans caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* gathered under the name “piroplasms” [12, 13]. In dogs, infection by parasites usually induces a syndrome characterized by hyperthermia and anaemia that can be fatal when complicated [12]. The severity of infection depends on various factors including the species involved, the age and immune status of the host [12]. Within the *Babesia* genus, the species *B. vogeli* is generally thought to be the less pathogenic and is characterized by a non homogenous clinicopathological pattern that may range from asymptomatic carriage to severe to fatal haemolytic anemia in young dogs and pups [14]. In Europe, four *Babesia* species have been identified to date in dogs: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* and *Babesia microti*-like also called *Theileria annae* or *Babesia* sp. “Spanish dog” [14]. In addition, sporadic dog infections with *Theileria equi* and *Babesia caballi* were recorded [15, 16]. *B. canis* is the most widely distributed of these species, coinciding with the distribution of its known tick vector *Dermacentor reticulatus* [14] whereas, *B. vogeli* is more often found around the Mediterranean basin where *Rhipicephalus sanguineus* is the predominant tick species [14].

In France, canine babesiosis has a high prevalence [17] and covers almost the whole country [18, 19]. Mean prevalence was estimated to 1.42% in 2005 [19]. Higher incidences are generally found in the Southwest of the country, including the West of the Mediterranean basin while the East of the Mediterranean basin and Corsica seems to remain free [18, 19]. Only few studies were conducted in France on molecular characterization of piroplasm species involved in canine babesiosis cases [16, 20–22]. *Babesia canis* is thought to be the main etiological agent of the disease [16, 17, 20]. *B. vogeli* was recently evidenced in southern France in four dogs with clinical signs clearly suggestive of canine babesiosis, two of which were young adult without known predisposing factors [22], however, its prevalence remains unknown in the country. Consequently, knowledge on epidemiology of canine babesiosis in France is limited, in particular in the Mediterranean basin where *R. sanguineus* ticks are frequently recorded. Moreover, the existence of canine babesiosis cases in the western French Mediterranean basin while the eastern seems free is a statement that should be further explored, particularly by focusing on the distribution of *Babesia/Theileria* species as well as the possible existence of different populations of *R. sanguineus* vectors in this area. Finally, molecular characterization of *Babesia vogeli* specimens would be useful to assess the possible existence of different strains that could explain the variability of symptoms observed within this species.

To get further insight into epidemiology of canine babesiosis in southern France, dog blood samples and ticks were collected from 2010 to 2012 and analyzed for the presence of piroplasms using specific PCR detection. Phylogenetic analyses were then performed to compare sequences obtained from French specimens to those originated worldwide. Our results allowed detection of *B. canis*, *B. vogeli* and *T. annae* in dogs and *B. canis* and *B. vogeli* in *R. sanguineus* ticks. Prevalence of *B. vogeli* infection in dogs and ticks was found significantly higher in Gard than in Corsica whereas *R. sanguineus* was the main tick species

retrieved from dogs in both areas. The possible existence of different *R. sanguineus* populations in southern France, suggested by these results, was investigated using a phylogenetic approach.

Methods

Samples collection and DNA extraction

The survey was conducted in 13 sites in southern France. Collection sites and their characteristics are presented in Figure 1 and Table 1.

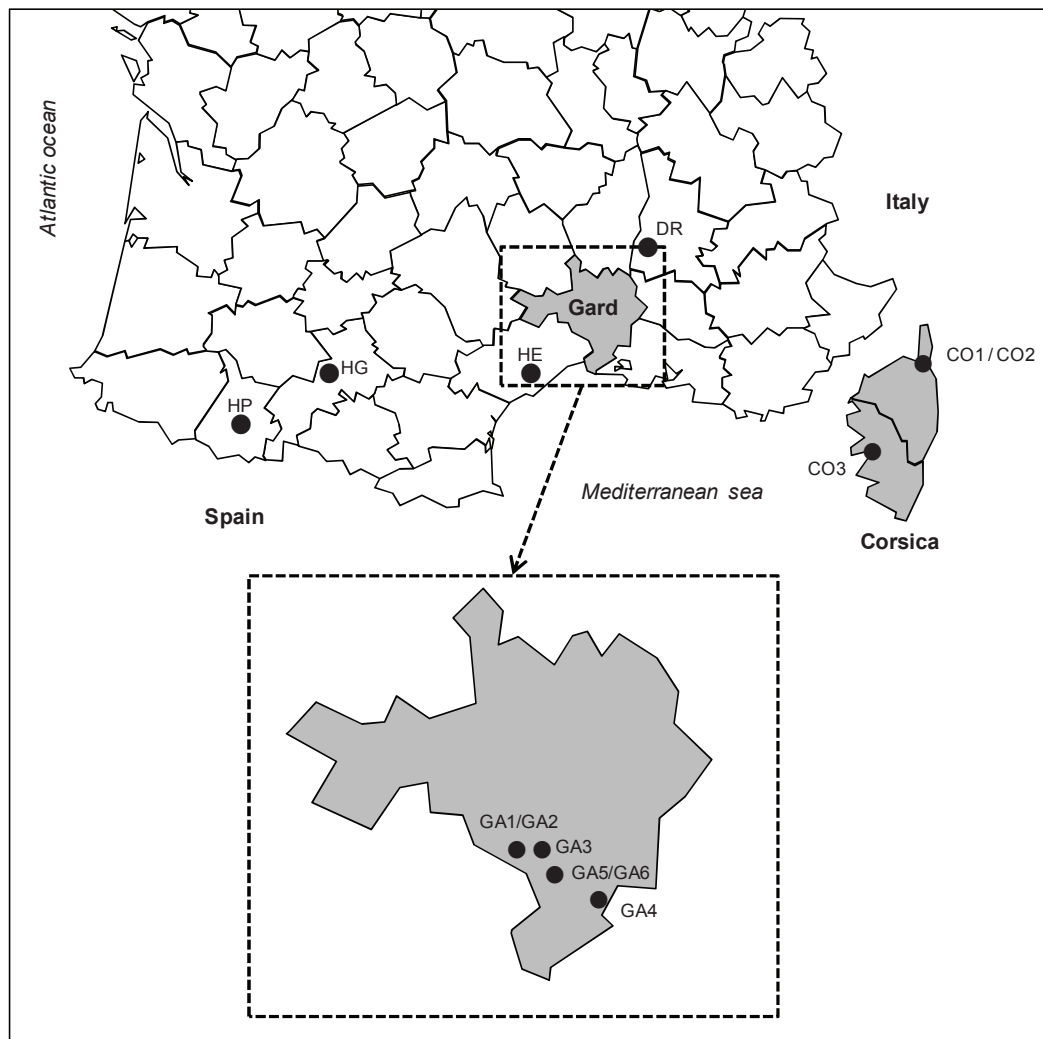


Figure 1: Map of sampling sites in southern France.

Table 1: Sampling locations and methods

Sites id. ¹	Location	Geographical coordinates	Characteristics	Collected samples	Ticks sampling method
DR	La Bégude de Mazenc, Drôme	44°32'N; 4°56'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
HE	Béziers, Hérault	43°20'N; 3°12'E	Veterinary clinic	Dog bloods	—
HG	Aurignac, Haute-Garonne	43°13'N; 0°53'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
HP	Trie sur Baïse, Hautes-Pyrénées	43°19'N; 0°22'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
GA1	Sommières, Gard	43°47'N; 4°05'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
GA2	Sommières, Gard	43°47'N; 4°05'E	Along a river with reeds, in town	Ticks	flagging
GA3	Calvisson, Gard	43°47'N; 4°11'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
GA4	Saint-Gilles, Gard	43°40'N; 4°26'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
GA5	Aigues-Vives, Gard	43°42'N; 4°13'E	Kennel	Dog bloods; Ticks	on dogs; visual inspection
GA6	Aigues-Vives, Gard	43°42'N; 4°13'E	Along a creek, in the vicinity of kennel	Ticks	flagging
CO1	Bastia, Corsica	42°41'N; 9°27'E	Veterinary clinic	Dog bloods; Ticks	on dogs
CO2	Bastia, Corsica	42°41'N; 9°27'E	Kennel	Dog bloods	—
CO3	Ajaccio, Corsica	41°55'N; 8°44'E	Kennel	Dog bloods; Ticks	on dogs

¹ Sites identification

Dog blood samples were provided by veterinarians or collected in kennels. All dogs suspected of canine babesiosis and/or that carried ticks were selected for blood and/or tick sampling. Dogs living for more than 3 years in kennels were also included. A questionnaire was submitted to the dog owners in order to obtain general information in particular on the travel history of the dog during the weeks before samples were taken. Venous blood samples were obtained from the cephalic or the jugular veins of dogs using blood collection tubes with anticoagulants (EDTA). A blood smear was systematically done extemporaneously with fresh or whole blood in EDTA. Blood smears were air dried and stored at room temperature whereas blood samples in collection tubes were stored at 5 °C +/- 1 °C until DNA extraction (within 5 days after collection). Ticks were retrieved from dogs or collected in the environment by visual picking or flagging as reported in Table 1. Ticks found on dogs were

carefully detached from their host without damaging the rostrum. All ticks collected in this way were stored in 70% ethanol until morphological identification and DNA extraction. They were identified under light microscopy using morphological identification keys [23, 24] followed by molecular characterization for selected samples [22]. DNA extractions from blood samples and ticks were performed as previously described [22]. The quality of DNA extractions was assessed by PCR amplification of fragments of the *mitosin* gene of dog and of the mitochondrial 16S rRNA gene of tick (Table 2) to confirm the presence of DNA and the absence of PCR inhibition as previously described [22].

Diagnostic PCR of *Babesia/Theileria* genera and *Babesia vogeli*

All tick and blood DNA samples were first analyzed by PCR diagnostic of both *Babesia* and *Theileria* genus using the nested set of primers BTF1 / BTR1 and BTF2 / BTR2 (Table 2) [25]. The amplification reactions were carried out in a thermocycler (Biometra® T gradient, Goettingen, Germany) in 25 µl of reaction mixture containing 30 ng of extracted DNA, 200 µM (each) deoxyribonucleotide, 0.625 U of Hotstartaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) and 12.5 pmol of each primer in the reaction buffer provided by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). Specific detection of *B. vogeli* was also performed from all blood and tick DNA samples using primers BCV-F and Ba721R [22] (Table 2). Positive (*Babesia rossi* and *Babesia vogeli* DNA obtained from MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) and negative controls (reaction mix without DNA) were used in each PCR reaction. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis through 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. *B. vogeli* positive diagnostic PCR products were sequenced at BIOFIDAL-DTAMB (FR BioEnvironment and Health, Lyon, France) and the sequences were analysed with the BLASTN program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *B. vogeli* sequences from bloods and ticks were

deposited in GenBank with accession numbers JX304662-JX304683 and JX871884-JX871892.

Table 2: Primers used in the study

Gene target	PCR target	Name	Fragment length	References
Mitosin gene	<i>Canis familiaris</i>	CAN-F	5'-CTTGTACACGGTAAGGTTTC-3'	290-bp [39]
		CAN-R	5'-CTGATGTATTCCTGCACCAAG-3'	
18S rRNA gene	<i>Babesia / Theileria spp.</i>	BTF1 (ext)	5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'	930-bp [25]
		BTR1 (ext)	5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'	
		BTF2 (int)	5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'	800-bp
		BTR2 (int)	5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'	
18S rRNA gene	<i>Babesia vogeli</i>	BCV-F	5'-GTGTTTCGAGTTTGCCATTTCG-3'	422-bp [22]
		Ba721R	5'-CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCTCAAG-3'	[40]
Mitochondrial 16S rRNA gene	<i>Ixodida</i>	TQ16S+1F	5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'	320-bp [27]
		TQ16S-2R	5'-ACGCTGTTATCCCTAGAG-3'	
Mitochondrial 12S rRNA gene	Ticks	Forward	5'-AAACTAGGATTAGATACCCTATTATTTTAG-3'	400-bp [6]
		Reverse	5'-CTATGTAACGACTTATCTTAATAAAGAGTG-3'	

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

PCR-RFLP was specifically developed to discriminate *Babesia* and *Theileria* species susceptible of infecting dogs in Europe by combining two previously published methods. *Babesia/Theileria* genus nested PCR was performed according to Jefferies et al. method [25] whereas RFLP using *TaqI* and *HinfI* enzymes was adapted from Carret et al. [26]. Positive controls of *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. rossi*, *B. vogeli*, *Theileria equi*, and *Theileria annae* (ie. *B. microti*-like or *Babesia* “Spanish dog”) extracted from infected bloods or cultures were obtained from diagnostic samples from the laboratory of parasitology and parasitic diseases (Vetagro Sup, Marcy l’Etoile, France) or were provided by Pr Theo Schetters (MSD Animal Health, Boxmeer, Netherlands), Pr K. Pfister (Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, University of Munich, Germany) and Dr A.

T. Camacho Garcia (Vigo, Spain). Their identity was confirmed by PCR amplification and sequencing. PCR products (10 µL) from bloods and tick samples were digested using *TaqI* and *HinfI* enzymes (Promega, Madison, WI, USA) at 65°C and 37°C respectively for 3 hours. The restriction fragments were examined by electrophoresis on 2% agarose gel. The patterns obtained were compared with those obtained with positive controls.

Phylogenetic analysis

DNA extracted from ticks were PCR amplified on the mitochondrial 16S rRNA and 12S rRNA genes as described by Black and Piesman [27] and Szabó et al. [6]. PCR products were sequenced and submitted to BLASTN analysis as described above and sequences were deposited in GenBank with accession numbers JX304684-JX304708 (16S mt-rDNA) and JX304709-JX304744 (12S mt-rDNA). Phylogenetic analyses were performed on *Rhipicephalus sanguineus* and *Babesia vogeli* sequences. In the case of *Rhipicephalus sanguineus* phylogenetic reconstruction, sequences of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA genes from ticks were compared to sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* from different parts of the world (Additional file 1). A similar analysis was performed with *B. vogeli* sequences of 18S rRNA gene (approximately 800-bp) from blood samples and *B. vogeli* sequences retrieved from GenBank (Additional file 2). Sequences were aligned using CLUSTALW and then adjusted manually using BIOEDIT software [28]. The resulting alignment was used to construct a maximum-likelihood tree using SEAVIEW v.4.2.12. (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>). The tree topology was tested by bootstrap analysis with 1000 resamplings.

Statistical analysis and meteorological data records

Statistical analyses were performed using R software [29]. Prevalence of *B. vogeli* infection in dogs and *R. sanguineus* ticks from Gard and Corsica was estimated by calculating the ratio of *B. vogeli* positive samples divided by the total number of samples analyzed throughout the study within each category. For dogs as for ticks, prevalence of *B. vogeli* infection in Gard was compared with that of Corsica using a Fisher's Exact Test.

Meteorological data from the Gard area (mean monthly maximum and minimum temperatures and rainfall amount) throughout the period covered by the study were retrieved from the French national meteorological service (<http://france.meteofrance.com/>) from the “Nîmes-Courbessac” station.

Results

Survey of ticks and dogs in southern France and sample selection

Dog bloods and ticks were collected from 2010 to 2012, in the 13 sites of southern France as presented in Table 1. The survey resulted in the selection of 155 dogs from which 140 bloods and 635 ticks were retrieved. In Gard (GA), 32 ticks were collected in the environnement as well. Three areas (Drôme DR, Gard GA and Corsica CO) provided most of blood and ticks samples. In Gard, samplings were done regularly which allowed to follow tick collections and babesiosis case detection throughout the study. In Hérault (HE), Haute-Garonne (HG) and Hautes-Pyrénées (HP), samplings resulted most of the time from canine babesiosis clinical suspicions. Results of tick and blood collections according to the location are presented in Table 3.

Table 3: Results of tick and dog blood collections per study site

Sites id. ¹	Sample source	Tick species ²				Dog bloods ³
		<i>D. reticulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>R. sanguineus</i> s.l.	Other ^{4 5 6}	
DR	Dogs	0/208 (0.0%)	18/208 (8.7%)	190/208 (91.3%)	0/208 (0.0%)	25/140 (17.9%)
HE		—	—	—	—	9/140 (6.4%)
HG		30/40 (75.0%)	4/40 (10.0%)	6/40 (15.0%)	0/40 (0.0%)	15/140 (10.7%)
HP		3/6 (50.0%)	2/6 (33.3%)	0/6 (0.0%)	1/6 (16.7%) ⁴	6/140 (4.3%)
GA		0/293 (0.0%)	0/293 (0.0%)	293/293 (100.0%)	0/293 (0.0%)	49/140 (35.0%)
CO		0/88 (0.0%)	3/88 (3.4%)	85/88 (96.6%)	0/88 (0.0%)	36/140 (25.7%)
Total		33/635 (5.2%)	27/635 (4.3%)	574/635 (90.4%)	1/635 (0.2%)	—
GA2	Environment ⁷	0/9 (0.0%)	0/9 (0.0%)	9/9 (100.0%)	0/9 (0.0%)	—
GA5		0/4 (0.0%)	0/4 (0.0%)	1/4 (25.0%)	3/4 (75.0%) ⁵	—
GA6		0/19 (0.0%)	0/19 (0.0%)	4/19 (21.1%)	15/19 (78.9%) ⁶	—
Total		0/32 (0.0%)	0/32 (0.0%)	14/32 (43.7%)	18/32 (56.3%)	—

¹ Sites identification² Number of ticks of the corresponding species / Total number of ticks identified in the area (percentage %)³ Number of dog bloods collected in the area / Total number of dog bloods collected (percentage %)⁴ One *Pholeoixodes hexagonus*⁵ Three *Rhipicephalus pusillus*⁶ One *Haemaphysalis* sp and 14 *Rhipicephalus pusillus*⁷ Identification of all *Rhipicephalus* sp. ticks retrieved from the environment was confirmed by amplification and sequencing of mt-16SrDNA of ticks

From the 635 ticks collected from dogs 574 were identified as *R. sanguineus* s.l., 33 as *Dermacentor reticulatus*, 27 as *Ixodes ricinus* and one as *Pholeoixodes hexagonus* using morphological keys. From the 32 ticks collected in the environment, 31 and one belonged to the *Rhipicephalus* and *Haemaphysalis* genera respectively.

All dog blood samples were submitted to DNA extraction. For ticks collected from dogs, only those presenting morphological criteria consistent with *Rhipicephalus sanguineus* s.l. identification were retained for subsequent DNA extraction. In case of dogs with low tick infestations, all the *R. sanguineus* ticks retrieved from the dogs were used. In cases of heavy infestations, ticks were randomly selected in accordance with proportion of each stage (larva,

nymph, adult male, adult female). For ticks collected in the environment, DNA was extracted from all ticks that were affiliated to the *Rhipicephalus* genus.

Further molecular identifications were performed for 36 *R. sanguineus* s.l. ticks from dogs and all *Rhipicephalus* sp. ticks from the environment by DNA amplification and sequencing of a 320-bp mitochondrial 16S rDNA fragment. All *R. sanguineus* s.l. ticks from dogs submitted to molecular identification were affiliated to *R. sanguineus* s.s. after BLAST analysis whereas, from the 31 *Rhipicephalus* sp. ticks collected in the environment, 14 were affiliated to *R. sanguineus* s.s. and 17 to *R. pusillus*.

Within the 588 *R. sanguineus* ticks collected on both dogs and the environment and identified using morphological or molecular methods, 337 (57.3%) were females, 207 (35.2%) were males and 44 (7.5%) were nymphs. From those 588 *R. sanguineus* ticks, 242 were used for DNA extraction and subsequent PCR analysis with respect, as far as possible, to proportions of each stage within each location. In particular, 186 out of the 242 *R. sanguineus* ticks submitted to DNA extraction, were from Gard and Corsica with the following distributions: 77 (63.6%) females, 39 (32.2%) males and 5 (4.1%) nymphs for samples from Gard and 43 (66.2%) females, 18 males (27.7%) and 4 (6.2%) nymphs for samples from Corsica.

Nested PCR-RFLP allows discrimination of piroplams

To validate specificity of the method, Nested PCR amplifications were first performed on 18 rRNA gene from infected dog bloods or parasite cultures of *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. rossi*, *B. vogeli*, *Theileria equi*, and *Theileria annae* (ie. *B. microti*-like or *Babesia* “Spanish dog”). RFLP profiles using both *TaqI* and *HinfI* enzymes allowed to discriminate all *Babesia/Theileria* species analyzed (Figure 2). Consequently, the method was validated for the identification of the majority piroplasm species that may be detected from dogs or *R. sanguineus* ticks in Europe.

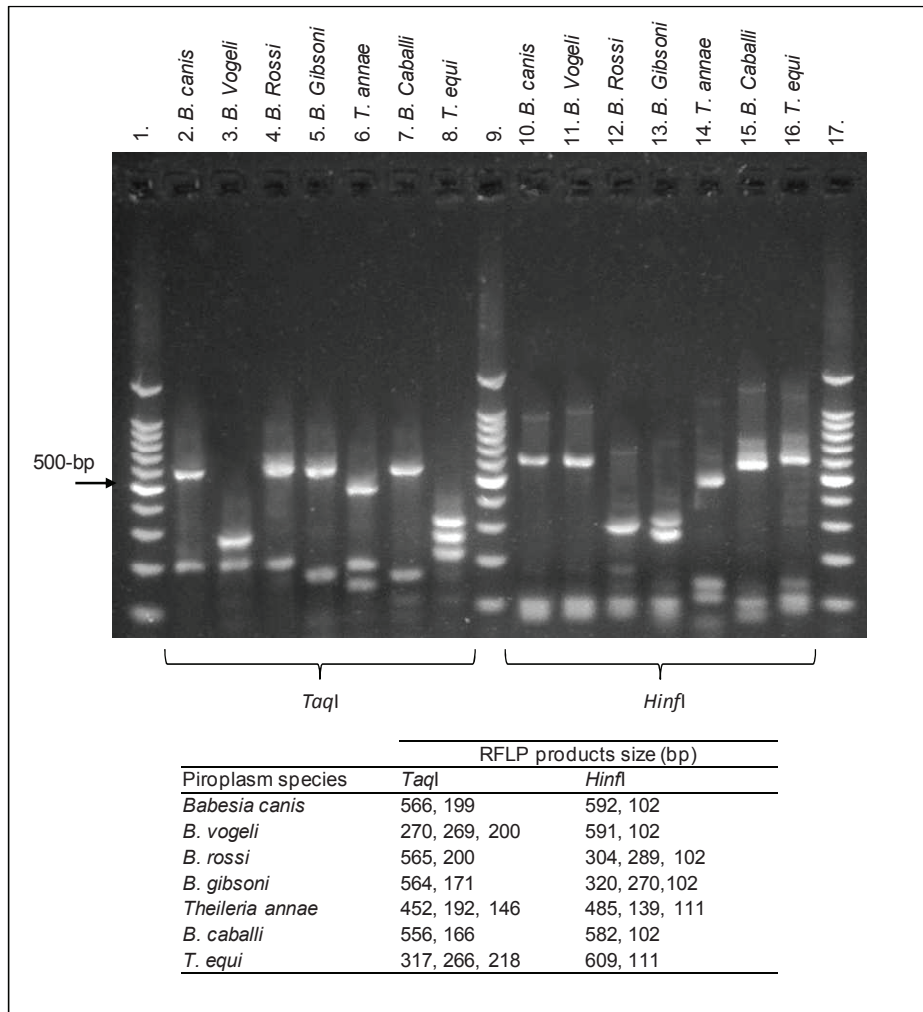


Figure 2: PCR-RFLP profiles of DNA from selected piroplasms species amplified with primer pairs BTF2 and BTR2. Lanes 2 to 8 and lanes 10 to 16 represent PCR products of pathogens digested with *TaqI* or *HinfI* restriction enzymes respectively. Lanes 1, 9 and 17 correspond to 100-bp molecular weight marker. Table reports the expected sizes for each piroplasm species.

Piroplams detection from dog bloods and *R. sanguineus* ticks

A total of 140 dog bloods and 242 *R. sanguineus* ticks were analyzed by diagnostic PCR using both *Babesia/Theileria* genus-specific nested PCR-RFLP and *B. vogeli* specific PCR on 18S rDNA (Table 4). Among the 140 dog bloods analyzed, 19 (13.6%) were positive to *B. vogeli*, 18 (12.9%) to *B. canis* and 1 (0.7%) to *Theileria annae*. Among the 242 *R. sanguineus*

ticks analyzed, 23 (9.5%) were positive to *B. vogeli* alone, 1 (0.4%) to *B. canis* alone and 3 (1.2%) to both *B. vogeli* and *B. canis*.

Table 4: Prevalence of piroplasm infections in dogs and *R. sanguineus* ticks per study site and main clinical data

Sample type	Sites id. ¹	Piroplasm species detected					
		<i>B. canis</i>		<i>B. vogeli</i>		Other	
		PCR results ²	Clinical data ⁵	PCR results ²	Clinical data ⁵	PCR results ²	Clinical data ⁵
Dog bloods	DR	0/25 (0.0%)	—	3/25 (12.0%)	H:3	0/25 (0.0%)	—
	HE	6/9 (66.7%)	S:6	2/9 (22.2%)	S:2	0/9 (0.0%)	—
	HG	8/15 (53.3%)	S:8	2/15 (13.3%)	S:2	0/15 (0.0%)	—
	HP	4/6 (66.7%)	S:4	0/6 (0.0%)	—	0/6 (0.0%)	—
	GA	0/49 (0.0%)	—	12/49 (24.5%)	S:11 ⁶ ; H:1	1/49 (2.0%)	H:1
	CO	0/36 (0.0%)	—	0/36 (0.0%)	—	0/36 (0.0%)	—
	Total	18/140 (12.9%)	S:18	19/140 (13.6%)	S:15; H:4	1/140 (0.7%) ⁴	H:1
<i>R. sanguineus</i> ticks		PCR results ²	Tick stade ⁷	PCR results ²	Tick stade ⁷	PCR results ²	Tick stade ⁷
	DR	1/56 (1.8%)	M:1	3/56 (5.4%)	M:1; F:2	0/56 (0.0%)	—
	GA	3/121 (2.5%) ³	F:3	20/121 (16.5%)	M:3; F:16; N:1	0/121 (0.0%)	—
	CO	0/65 (0.0%)	—	3/65 (4.6%)	M:1; F:2	0/65 (0.0%)	—
	Total	4/242 (1.7%)	M:1; F:3	26/242 (10.7%)	M:5; F:20; N:1	0/242 (0.0%)	—

¹ Sites identification

² Number of samples positive by diagnostic PCR / Number of samples analyzed per location (percentage %)

³ The 3 ticks positive to *B. canis* were also positive to *B. vogeli* species specific PCR

⁴ RFLP and sequencing confirmed the affiliation of the protozoa to *Theileria annae*

⁵ Clinical data associated with positive samples. "—": Not applicable; S: Number of dogs with babesiosis symptoms; H: Number of healthy dogs

⁶ One dog was asymptomatic the day when it was blood sampled but declared babesiosis 2 days later

⁷ Tick stade of positive samples: "—": Not applicable; M: Adult male; F: Adult female; N: Nymph

PCR products from bloods and ticks positive for *Babesia vogeli* were sequenced and showed 98.4% to 100% identity to each other. Blast analysis affiliated these sequences with *B. vogeli* (99% to 100% identity) from France [GenBank: AY072925], USA [GenBank: AY371198], China [GenBank: HM590440], Venezuela [GenBank: DQ297390], Japan [GenBank: AB083374, AY077719], Romania [GenBank: HQ662635], Egypt [GenBank: AY371197] and

Brazil [GenBank: AY371194-AY371196]. In addition, the sequence obtained from the sample whose RFLP profile was similar to that of *Theileria annae* showed 99.8% identity with 18S rRNA gene sequences of *Babesia* sp. ‘Spanish dog’ from Spain [GenBank: AF188001, AY534602] and USA [GenBank: EU583387], as expected. This particular sequence was deposited in GenBank under accession number JX454779.

From the 242 *R. sanguineus* ticks analyzed, 26 were positive to *B. vogeli* ticks, including 20 females (76.9%), 5 males (19.2%) and one nymph (3.8%). Among them, six *B. vogeli* positive ticks were retrieved from negative dogs in Drôme and Corsica (Ajaccio area). Among the twenty *B. vogeli* positive ticks from Gard, five were retrieved from *B. vogeli* positive dogs, thirteen were retrieved from negative dogs, whereas two specimens were collected from the environment. Eight were previously detected and published [22] and twelve, including the two positive ticks collected in the environment, were new confirmed infections. Overall, the prevalence of *B. vogeli* infection in *R. sanguineus* ticks was significantly higher ($p < 0.02$) in Gard (16.5%) than in Corsica (4.6%).

From the 19 dogs positive to *B. vogeli*, 12 were diagnosed in the Gard. Among them, 4 were previously published [22] and 8 were new confirmed cases from this area. Conversely, in Corsica, none of the 36 dog blood samples analyzed was found infected with *Babesia/Theileria* species. Consequently, prevalence of *B. vogeli* infection in dogs was significantly higher ($p < 0.001$) in the Gard (24.5%) than in Corsica (0%).

Main clinical data (presence or not of symptoms suggestive of canine babesiosis) from dogs infected with piroplasm species are presented in Table 4. From the 19 dogs infected with *B. vogeli*, 15 were symptomatic whereas 4 had no clinical sign suggestive of babesiosis. Twelve

out of the 15 symptomatic dogs were detected by *Babesia/Theileria* nested-PCR whereas *B. vogeli* specific PCR allowed detection of all symptomatic and 4 asymptomatic dogs, suggesting a higher sensibility of the *B. vogeli* specific PCR method.

In Gard, results of meteorological data records, *R. sanguineus* collection and *B. vogeli* detection from dogs according to the date of sampling are presented in Figure 3. In 2010 and 2011, *R. sanguineus* ticks were mainly retrieved from dogs from March to September with a peak of infestation in April (Figure 3A). Canine babesiosis cases, mainly caused by *B. vogeli* in this area, were recorded from March to July (Figure 3A). Analysis of meteorological data from Gard suggested a correlation between temperature and dog infestations with *R. sanguineus* ticks. In particular, during the 3 years of the survey, a mean monthly temperature above a threshold value of 10°C in spring, resulted in detection of dog infestations with *R. sanguineus* ticks (Figure 3B).

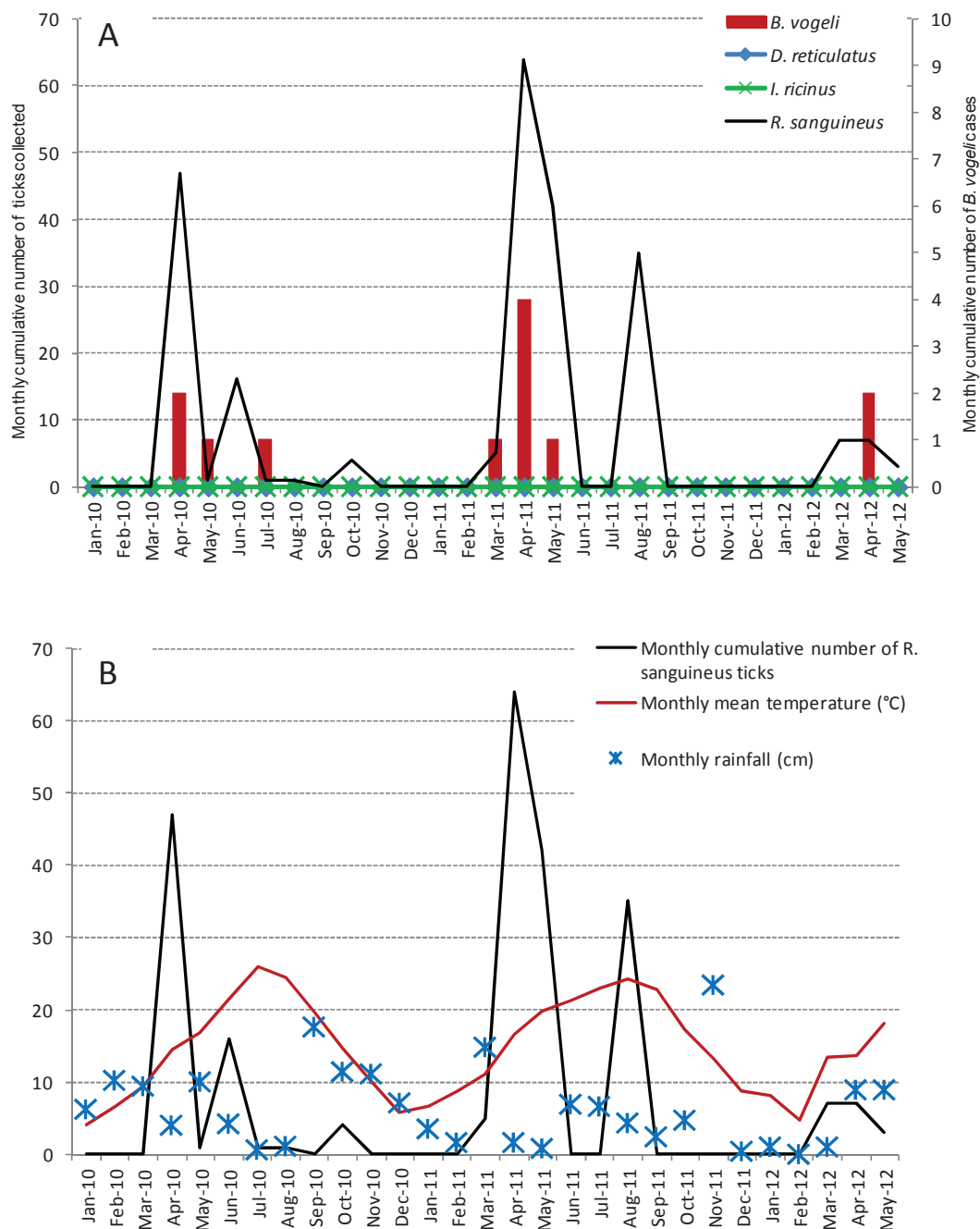


Figure 3: Results of tick collections, *Babesia vogeli* detections and meteorological records in Gard between January 2010 and May 2012. A. *R. sanguineus*, *D. reticulatus* and *I. ricinus* collection from dogs and number of canine babesiosis cases caused by *B. vogeli*. B. Number of *R. sanguineus* collected and meteorological data (mean monthly temperature and monthly rainfall). Only ticks retrieved from dogs in veterinary clinics were included in the analysis to avoid bias induced by potentially high number of ticks obtained during sampling campaigns in kennels or in the environment.

Phylogenetic analysis of *R. sanguineus* and *B. vogeli* sequences

As the prevalence of *B. vogeli* infection in dogs and in *R. sanguineus* tick was significantly different between Gard and Corsica, both sites were chosen for further phylogenetic analyses. To that purpose, 36 ticks (22 from Gard and 14 from Corsica) were selected. BLASTN analysis of their mitochondrial 16S and 12S rDNA sequences confirmed their affiliation with *R. sanguineus* (97% to 98% identity). Mitochondrial 16S and 12S rDNA sequences from these 36 ticks were concatenated using the Seaview software [30], and the resulting 718 to 720-pb sequences were used to construct a matrix of sequence similarity and to estimate percentage of sequence divergence using Bioedit v7.0.5.3. Sequence divergence was estimated from 0% to 1.9% on the concatenated sequences.

To construct *R. sanguineus* phylogenetic trees, sequences of each Mitochondrial 16S and 12S rDNA were used separately and compared to sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* retrieved from GenBank (Additional file 1). The topology of trees clearly showed the existence of two clusters (A and B) in which sequences of both *R. sanguineus* and *R. turanicus* are mixed (Figures 4 and 5). Cluster A was supported by bootstrap values of 99% and 80% while cluster B was supported by bootstrap values of 83% and 91%, on mitochondrial 16S and 12S rDNA trees respectively. Cluster A consisted of sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* from Asia (Thailand, Taiwan), northern South-America (Brazil, Colombia) and southern Africa (South-Africa, Zimbabwe and Zambia). Inside this cluster A, sequences of *R. turanicus* from Israel, Uzbekistan and Kyrgyzstan formed a sub-group supported by a strong bootstrap value of 97% (Figure 5). Cluster B assembled sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* from Europe (France, Switzerland, Spain, Italy, Portugal), Egypt, USA and southern South-America (Argentina, Chile, Uruguay). All *R. sanguineus* sequences obtained in this study clustered in group B in the two trees.

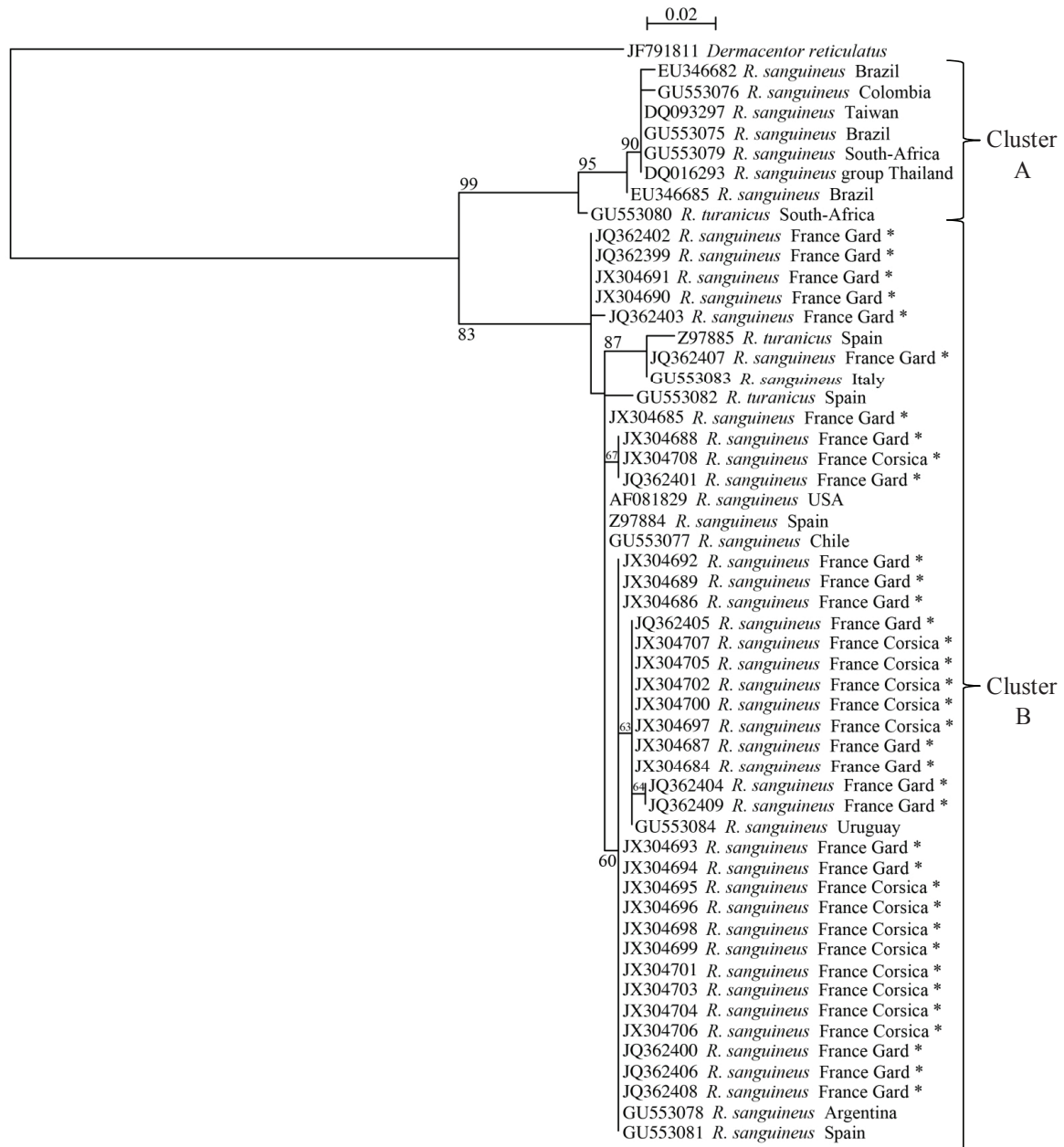


Figure 4: Phylogenetic analysis based on 263-bp of mitochondrial 16S rRNA gene sequences of *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Gard and Corsica and sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* isolates from different parts of the world (Additional file 1). Identity and GenBank accession numbers are indicated for each sample. The countries where samples were isolated are also given. The phylogenetic tree was constructed using the Hasegawa, Kishino and Yano maximum likelihood method, with bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 50\%$. The tree was rooted using

Dermacentor reticulatus as an outgroup. Subsequent analyses using the Kimura's two-parameter (K2P) distance method and the parsimony method in the same conditions confirmed the topology of the tree.

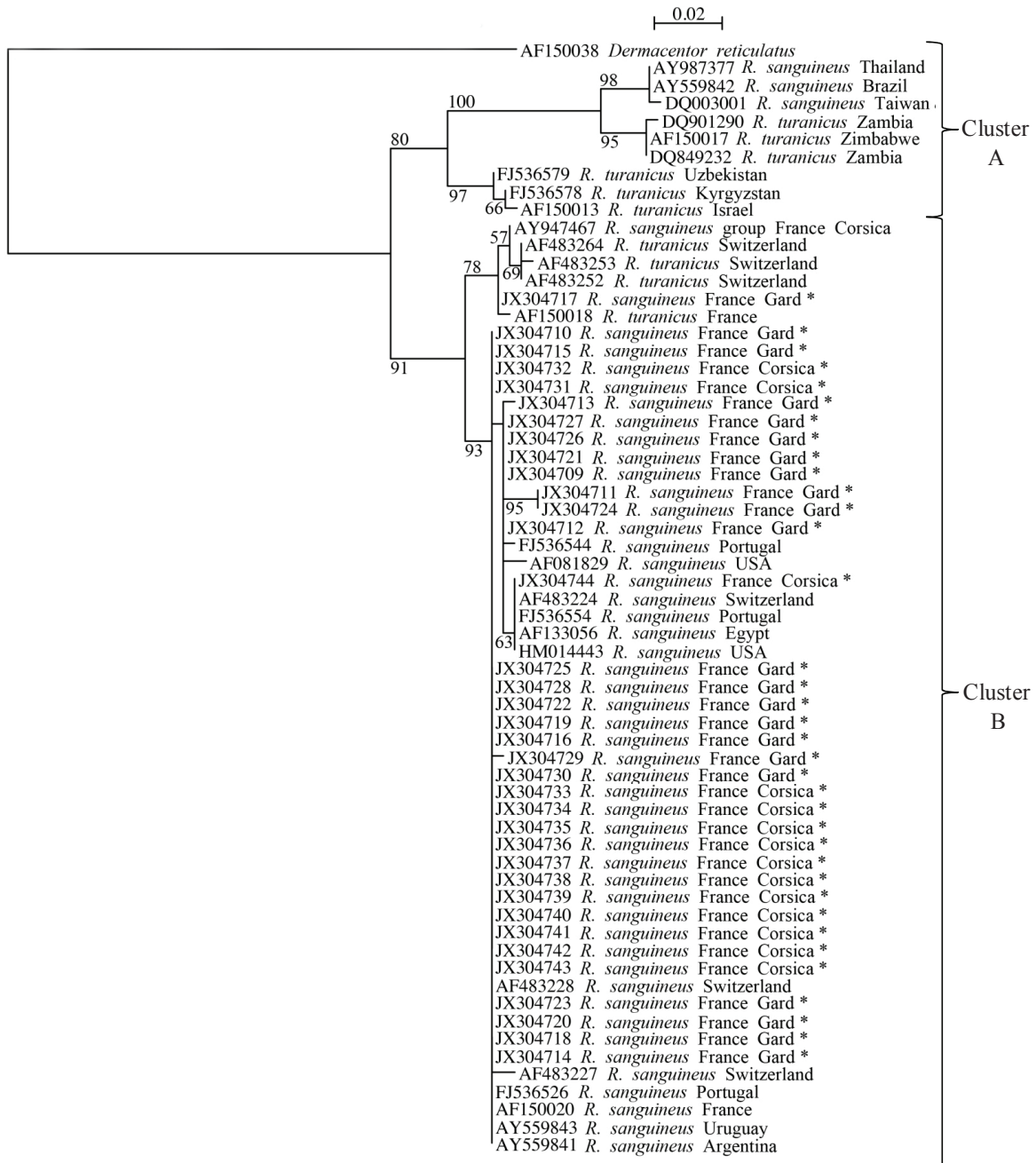


Figure 5: Phylogenetic analysis based on 317-bp of mitochondrial 12S rRNA gene sequences of *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Gard department and Corsica and sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* isolates from different parts of the world (Additional file 1). Identity and GenBank accession numbers are indicated for each sample. The countries where

samples were isolated are also given. The phylogenetic tree was constructed using the Hasegawa, Kishino and Yano maximum likelihood method, with bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 50\%$. The tree was rooted using *Dermacentor reticulatus* as an outgroup. Subsequent analyses using the Kimura's two-parameter (K2P) distance method and the parsimony method in the same conditions confirmed the topology of the tree.

In another hand, a total of 9 *B. vogeli* sequences of 18S rDNA amplified from dog bloods (six from the present study and 3 from a previous one [22]) was compared to *B. vogeli* sequences from samples originated worldwide using phylogenetic analysis (Additional file 2 and Figure 6). Three clusters (1 to 3) of sequences were clearly evidenced with consistent bootstrap values ($>64\%$), while 8 sequences were located along the vertical branch; these sequences were gathered under the name “cluster 4”. Cluster 1, which was supported by a bootstrap value of 86%, assembled sequences from countries of East and South of the Mediterranean basin (Romania, Egypt, Tunisia, Turkey). Cluster 2 contained sequences from southern Africa (South-Africa, Nigeria) with bootstrap value of 64%. Cluster 3 was supported by a bootstrap value of 66% and hosted sequences from Argentina, USA and countries of West and North of the Mediterranean basin (France, Spain, Italy and Croatia). Cluster 4 consisted of sequences from Asia (China, Japan, Taiwan, Hong-Kong), Australia and northern South-America (Brazil, Venezuela). Polymorphic positions (transitions or transversions) of nucleotides in sequences of the four *Babesia vogeli* clusters according to *Babesia vogeli* complete 18S rDNA sequence AY072925 [31] are presented in Table 5.

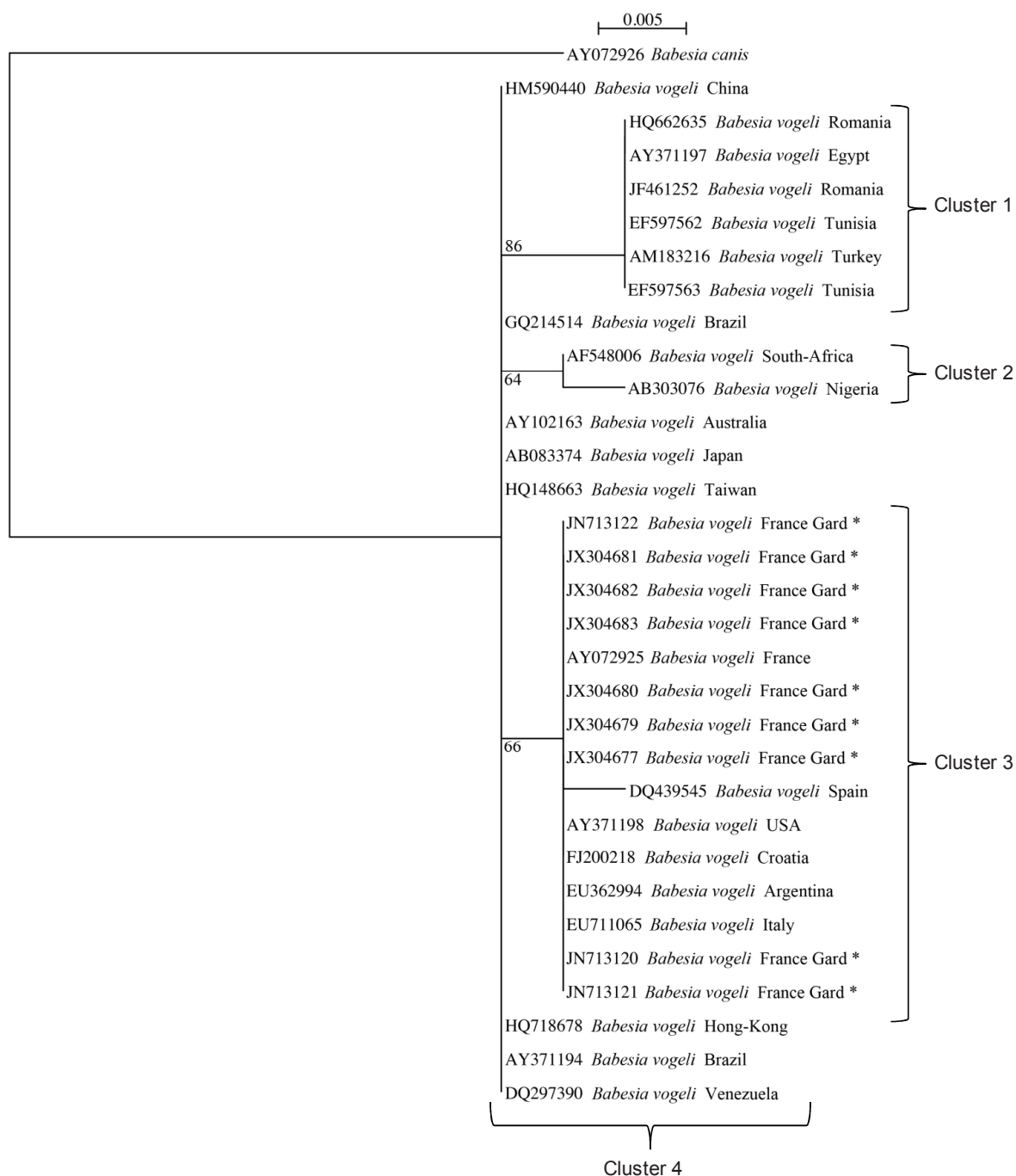


Figure 6: Phylogenetic analysis based on 283-bp of 18S rRNA gene sequences of *Babesia vogeli* obtained from naturally infected dogs from Gard and sequences of several *Babesia vogeli* isolates from GenBank (Additional file 2). Identity and GenBank accession numbers are indicated for each sample. For *Babesia vogeli* samples, the countries where samples were isolated or where the infections had occurred are also given. The phylogenetic tree was constructed using the Hasegawa, Kishino and Yano maximum likelihood method, with

bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 50\%$. The tree was rooted using *Babesia canis* as an outgroup. Subsequent analyses using the Kimura's two-parameter (K2P) distance method and the parsimony method in the same conditions confirmed the topology of the tree.

Table 5: Comparison of 283-bp *B. vogeli* 18S rDNA cluster of sequences with *B. vogeli* sequence AY072925

Genotype	Polymorphic positions					
	488 *	585	599	632	656	669
AY072925 (Cluster 3)	C	A	T	T	T	T
Cluster 1	A	..	C	C
Cluster 2	A	G	T/C	..
Cluster 3	T/A
Cluster 4	A

* numbering according to sequence AY072925 [31]

Geographical distribution pattern of *B. vogeli* and *R. sanguineus* sequences

To illustrate the possible genetic relationship between the pathogen *B. vogeli* and its vector *R. sanguineus*, sequences obtained from this study were compared to a large panel of sequences retrieved from specimens with worldwide distribution (Figure 7). By placing phylogenetic clusters according the geographic origin of samples, results showed that *R. sanguineus* belonging to cluster A were mainly distributed between latitudes 30°N and 30°S while those of cluster B, including specimens from France, were mainly distributed above 30°N and below 30°S. All *B. vogeli* sequences of clusters 2 and 4 were originated from countries where all *R. sanguineus* ticks sequences belonged to cluster A. Similarly, all *B. vogeli* sequences of clusters 1 and 3 corresponded to countries where all *R. sanguineus* ticks sequences belonged to cluster B.

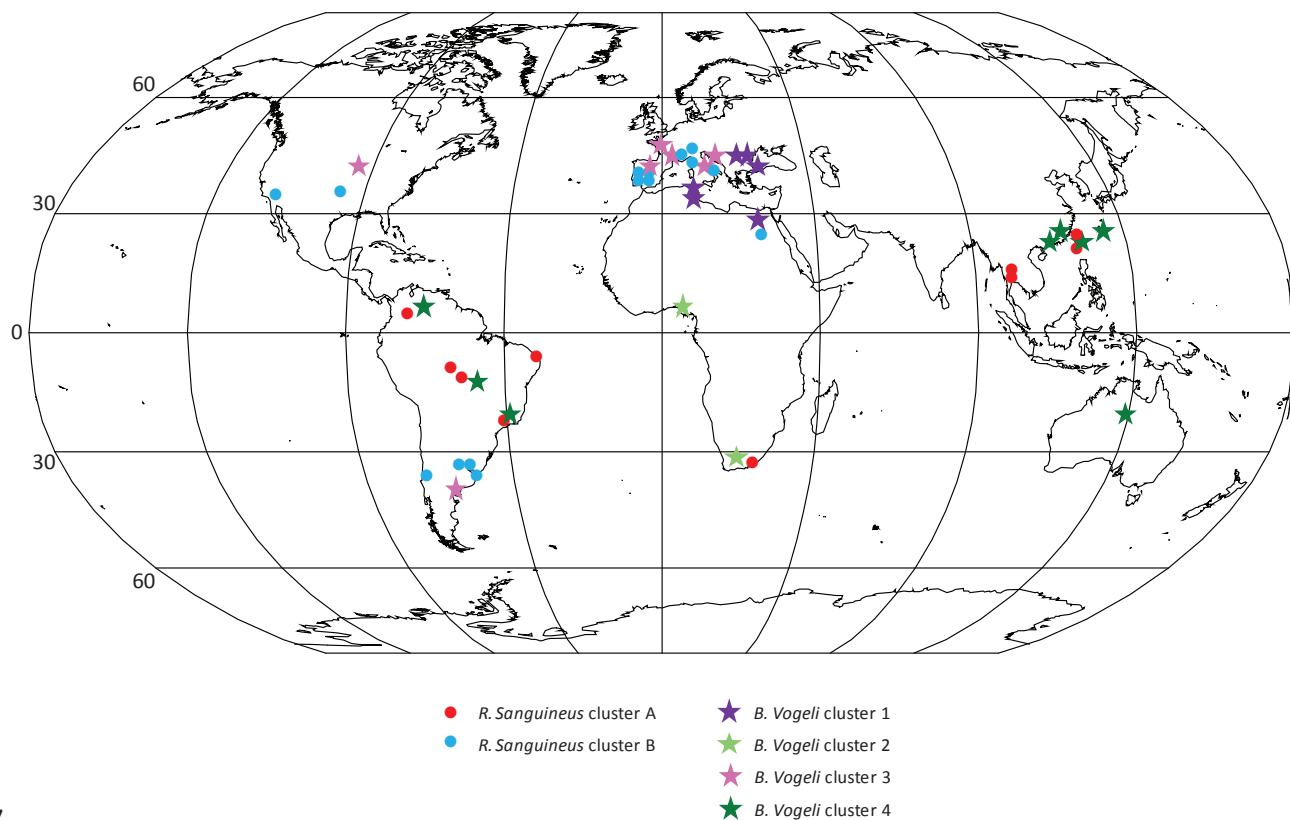


Figure 7: Biogeography of *R. sanguineus* and *B. vogeli* isolates determined by phylogenetic analyses. Clusters of sequences correspond to those defined in Figures 4, 5 and 6. Note that *B. vogeli* clusters 2 and 4 are associated with *R. sanguineus* cluster A and that *B. vogeli* clusters 1 and 3 are associated with *R. sanguineus* cluster B.

Discussion

The pathogen *B. vogeli* was recently detected for the first time in 4 dogs and 8 *Rhipicephalus sanguineus* ticks near Sommières (Gard department) in southern France [22]. However, knowledge on pathogens responsible for canine babesiosis and involvement of *R. sanguineus* in the transmission of the disease in this area remains scarce. Such information would be of interest to better adapt preventive measures and assess efficacy of treatments and vaccines currently available in the country. In this way, a large scale study was initiated, by focusing on several

locations from southern France, to provide an estimation of the prevalence of infection with *B. vogeli* and other piroplasms in dogs and *R. sanguineus* ticks.

Different and complementary methods can be used for the evaluation of the prevalence of piroplasm infection in dogs. Among them, serology is less employed because of its lack of species specificity whereas molecular methods are generally known to be more sensitive and specific [9]. A RFLP method, using *TaqI* and *HinfI* restriction enzymes on amplification products of piroplasm 18S rDNA, was previously developed to discriminate species capable of infecting dogs, in particular *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *B. rossi*, *B. vogeli*, and *B. microti*-like (also called *T. annae*) [26, 32, 33]. Molecular methods developed for piroplasm detection in ticks are less common. In the present study, a nested-PCR [25], whose high sensitivity was previously shown for *Babesia* and *Theileria* species detection from bloods, was tested on *R. sanguineus* tick samples. RFLP using *TaqI* and *HinfI* enzymes was adapted on this nested-PCR and proved its ability to differentiate species that might infect *R. sanguineus* ticks and dogs in Europe. As *B. vogeli* species specific PCR previously proved its capacity to detect the pathogen in ticks [22], the method was also used on blood and tick samples to ensure a high sensibility of detection for this pathogen. Thus, using both methods, it was possible to detect *B. vogeli* in 15 symptomatic (including one dog that declared babesiosis 2 days after blood sampling) and 4 healthy dogs as well as in 26 *R. sanguineus* ticks in southern France. However, only *B. vogeli* species specific PCR allowed detection of asymptomatic carriage in dogs. Moreover, 21 *B. vogeli* positive ticks were only detected by this method, confirming its higher sensitivity.

Majority of *B. vogeli* infections in dogs (12/19; 63.2%) and ticks (20/26; 76.9%) were detected in Gard. Moreover, in this area *B. vogeli* was the main piroplasm species recorded from both dogs and *R. sanguineus* ticks (except for a single *Theileria annae* dog infection and four *B. canis* tick infections). From the 20 *B. vogeli* positive ticks from Gard, 13 were

retrieved from negative dogs, 5 were retrieved from *B. vogeli* positive dogs and 2 were collected by flagging in the environment. Dog infections with *B. vogeli* were mainly recorded from March to July and were clearly linked with *R. sanguineus* ticks activity in the area (Figure 3A). These results allowed to confirm the endemicity of *B. vogeli* infection and support the possible existence of a hot spot of infection in Gard. They also support the role of *R. sanguineus* as the most probable vector of the disease in this area as it was previously suggested [22]. Analysis of meteorological data suggested that temperature might play an important role in host questing activity of *R. sanguineus* ticks as it was previously shown [4, 34]. In particular, the reproducibility of our observations regarding the increase of ticks infestation when mean monthly temperature went above a threshold value of 10°C is interesting without allowing to conclude however that this parameter is the only responsible for the increase in ticks activity. Conversely, no link was clearly evidenced between rainfall and *R. sanguineus* ticks activity.

Using RFLP-PCR method it was also possible to detect DNA of *B. canis* in 4/242 (1.7%) *R. sanguineus* ticks. To date *Dermacentor* sp. ticks are the only confirmed vector of *B. canis* in the world [9, 14]. Each *Babesia* species is generally thought to be specific for a single tick vector in a particular geographic area [35]. DNA of *B. canis* was previously detected in *R. sanguineus* ticks in Italy and a vertical transmission was demonstrated [36, 37]. The high prevalence of *B. canis* infections in dogs in France makes the probability of acquisition of pathogenic agent by *R. sanguineus* ticks highly probable. However, the absence of *B. canis* infection in dogs from the present study in places where *B. canis* was recorded from *R. sanguineus* ticks does not support a possible role of *R. sanguineus* in the transmission of the pathogen. Further studies should be conducted in the future to conclude.

In Hérault (HE) and Haute-Garonne (HG) both *B. canis* and *B. vogeli* pathogen were detected from dogs whereas in Hautes-Pyrénées (HP) only *B. canis* infections were evidenced. *B.*

vogeli and *T. annae* were the only piroplasms detected in dogs from Gard and no canine babesiosis case was recorded from Corsica. No dog was found infected with *B. gibsoni* which suggests a low prevalence of dog infections with this Protozoan in southern France as previously reported [12, 14]. The prevalence of infection with *B. vogeli* was shown to be significantly higher for dogs and ticks in Gard in comparison with Corsica whereas *R. sanguineus* was the main tick species collected in both areas. The detection of *B. vogeli* in 3 *R. sanguineus* ticks from Corsica collected near Ajaccio suggests a possible circulation of the pathogen in the island, which might be low as confirmed by the absence of detection of pathogen in all the 36 dog bloods analyzed. Results of the present study are consistent with previous ones that showed higher incidences of canine babesiosis in the Southwest of the French Mediterranean basin compared to the East and Corsica [18, 19]. However, our results showed that two factors can explain the distribution of canine babesiosis cases recorded 1) the *Babesia* species involved i.e. the existence of both *B. canis* and *B. vogeli* species in the southwest of French Mediterranean basin and 2) a significant difference in prevalence of infection with *B. vogeli* between Eastern (Gard) and Western (Corsica) areas. Regarding these results an analysis of *R. sanguineus* sequences divergence was performed to assess whether the genetic variability within *R. sanguineus* isolates could explain the differences in *B. vogeli* prevalences observed. After analyzing mitochondrial 16S and 12S rRNA sequences of ticks (22 from Gard and 14 from Corsica), no correlation could be done between variability of sequences and geographical origin of isolates. Further studies using other molecular tools (in particular microsatellites) or targeting a larger number of genes should be conducted in the future to conclude. An analysis of possible co-infection in the vector could be another research approach.

Taking into account the very slight morphological differences that exists between *R. sanguineus* and *R. turanicus* species, phylogenetic analysis included sequences of both

species retrieved from GenBank. Results obtained from phylogenetic analysis of *R. sanguineus* and *R. turanicus* sequences are in accordance with previous ones that segregated sequences of both species into two distinct clades [6, 7]. Our results support the previously suggested hypothesis of the existence of two dissimilar populations of *R. sanguineus* ticks in the world with a clear differentiation between ‘tropical’ species and ‘temperate’ species [5–7, 38]. As expected, all the *R. sanguineus* sequences from Gard and Corsica clustered with sequences of ‘temperate’ group. Phylogenetic analysis of *B. vogeli* sequences from France confirmed the strong similarity of *B. vogeli* sequences retrieved from dogs in the country [22, 31]. Confrontation of the topology of phylogenetic trees obtained for ticks and pathogens supports the hypothesis of a possible co-evolution between the pathogen and vector in relation to their geographical origin. However, the lack of sequences of pathogens from naturally infected ticks is a limiting factor for the realization of such an analysis. Finally, to assess the possible repercussions of genetic variability within *B. vogeli* and *R. sanguineus* species on vector capacities, it would be interesting to perform cross-infections using ‘tropical’ or ‘temperate’ species of *R. sanguineus* contaminated with different strains of *B. vogeli*.

Conclusions

This survey on both dogs and *R. sanguineus* ticks conducted from 2010 to 2012 in southern France provided new information on epidemiology of canine babesiosis in France and confirmed the endemicity of *B. vogeli* infection in the Gard department. It also enabled to characterize on a molecular level 36 *R. sanguineus* and 7 new *B. vogeli* isolates from this area. Further studies using molecular tools and covering a wider territory should be conducted in the future in order to better understand the epidemiology of canine babesiosis in this area. This should provide a better understanding of spatial distribution of piroplasm species involved in canine babesiosis cases and allow to evaluate the relative prevalence and the

temporal distribution of dog infections in places where both *B. canis* and *B. vogeli* pathogens could coexist. Such information would be of interest to better adapt preventive measures and assess efficacy of treatments and vaccines currently available in the country. This study also support the existence of at least two group of species or sub-species within the *R. sanguineus* species. These information are of interest if one take into account the human and veterinary relevance of this tick species.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

MRM was involved in all phases of the study, including sampling and data collection, laboratory work, data analysis, intellectual interpretation and writing of the manuscript. CVM, LC and PM designed the study project, supervised the study and were involved in data analysis, intellectual interpretation and critical revision of the manuscript for publication. JC was involved in laboratory works, data analysis, intellectual interpretation and critical revision of the manuscript for publication. GB supervised the study and was involved in intellectual interpretation and critical revision of the manuscript for publication. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

¹. University of Lyon, VetAgro Sup, Vector-borne haemopathogens team, Marcy l'étoile, France.

². University of Lyon, Microbial Ecology, UMR CNRS 5557, INRA USC 1193, VetAgro Sup, University Lyon 1, Villeurbanne, France.

Acknowledgements

This work was financially supported by Merial (Lyon, France) and Centre National de la Recherche Scientifique (France). We sincerely thank Vets Christophe Hugnet, Jean Pierre Beaufils, Sarah Warnery, Bernard Fabrizio, Marie and Thierry Segalen for their help with fieldwork. We also thank Dr Frederic Beugnet (Merial, Lyon, France) for his contribution to tick identifications and Pr Theo Schetters (MSD Animal Health, Boxmeer, Netherlands), Pr K. Pfister (Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, University of Munich, Germany) and Dr A. T. Camacho Garcia (Vigo, Spain) for providing *Babesia* and *Theileria* samples.

References

1. Gilot B, Perez-Eid C: **Bio-écologie des tiques induisant les pathologies les plus importantes en France.** *Méd Mal Infect* 1998, **28**:325–334.
2. Dantas-Torres F: **The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control.** *Vet Parasitol* 2008, **152**:173–185.
3. Dantas-Torres F: **Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:26.
4. Lorusso V, Dantas-Torres F, Lia RP, Tarallo VD, Mencke N, Capelli G, Otranto D: **Seasonal dynamics of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, on a confined dog population in Italy.** *Med Vet Entomol* 2010, **24**:309–315.
5. De Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabó MPJ, Mathias MIC: **Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina.** *Vet Parasitol* 2005, **129**:139–147.

- 580 6. Szabó MPJ, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielmone AA: **Biological and DNA**
581 **evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group**
582 **(Acari: Ixodidae) in South America.** *Vet Parasitol* 2005, **130**:131–140.
- 583 7. Burlini L, Teixeira KRS, Szabó MPJ, Famadas KM: **Molecular dissimilarities of**
584 ***Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples**
585 **throughout the world: is there a geographical pattern?** *Exp Appl Acarol* 2010, **50**:361–
586 374.
- 587 8. Baneth G: **Perspectives on canine and feline hepatozoonosis.** *Vet Parasitol* 2011, **181**:3–
588 11.
- 589 9. Irwin PJ: **Canine babesiosis.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010, **40**:1141–1156.
- 590 10. Dantas-Torres F: **Canine vector-borne diseases in Brazil.** *Parasit Vectors* 2008, **1**:25.
- 591 11. Novacco M, Meli ML, Gentilini F, Marsilio F, Ceci C, Pennisi MG, Lombardo G, Lloret
592 A, Santos L, Carrapiço T, Willi B, Wolf G, Lutz H, Hofmann-Lehmann R: **Prevalence and**
593 **geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean**
594 **countries and analysis of risk factors for infection.** *Vet Microbiol* 2010, **142**:276–284.
- 595 12. Irwin PJ: **Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control.** *Parasit Vectors*
596 2009, **2** (Suppl 1):S4.
- 597 13. Vannier E, Krause PJ: **Update on babesiosis.** *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009,
598 **2009**:984568.
- 599 14. Solano-Gallego L, Baneth G: **Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological**
600 **and clinical spectra.** *Vet Parasitol* 2011, **181**:48-60.
- 601 15. Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculic A, Beck A, Zivcinkjak T, Cacciò SM: **Diversity of**
602 ***Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia.** *Int J*
603 *Parasitol* 2009, **39**:843-848.

- 604 16. Fritz D: **A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March**
605 **2006 to March 2008)**. *Parasitol Res* 2010, **106**:1339–1342.
- 606 17. Bourdoiseau G: **Canine babesiosis in France**. *Vet Parasitol* 2006, **138**:118–125.
- 607 18. Bourdoiseau G, Renard N: **Résultats d’une enquête en France sur les cas suspectés ou**
608 **confirmés de babésiose chez le chien (in French)**. *Nouveau Prat Vét* 2005, **août-septembre**
609 **2005**:37–42.
- 610 19. Lasbleiz M: **Situation actuelle de la babésiose canine en France: bilan d’une enquête**
611 **nationale**. *Veterinary thesis*, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes; 2007.
- 612 20. Beugnet F, Marié JL: **Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in**
613 **Europe**. *Vet Parasitol* 2009, **163**:298–305.
- 614 21. Criado-Fornelio A, Buling A, Pingret JL, Etievant M, Boucraut-Baralon C, Alongi A,
615 Agnone A, Torina A: **Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and**
616 **molecular characterization**. *Vet Parasitol* 2009, **159**:73–76.
- 617 22. René M, Chêne J, Beauflis JP, Valiente Moro C, Bourdoiseau G, Mavingui P, Chabanne
618 L: **First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected**
619 **dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France**. *Vet Parasitol* 2012,
620 **187**:399–407.
- 621 23. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR: *Ticks of Domestic Animals in the*
622 *Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species*. Zaragoza: University of
623 Zaragoza; 2004.
- 624 24. Pérez-Eid C: *Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*.
625 Paris, Editions TEC&DOC; Cachan, Editions Médicales Internationales; 2007.
- 626 25. Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ: **PCR-RFLP for the detection and differentiation of**
627 **the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies**. *Vet*
628 *Parasitol* 2007, **144**:20–27.

- 629 26. Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout É, Moubri K, Schetters TP, Gorenflot
630 A: ***Babesia Canis Canis*, *Babesia Canis Vogeli*, *Babesia Canis Rossi*: Differentiation of the**
631 **Three Subspecies By A Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis On**
632 **Amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes.** *J Eukaryot Microbiol* 1999, **46**:298–301.
- 633 27. Black WC, Piesman J: **Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on**
634 **mitochondrial 16S rDNA sequences.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994, **91**:10034–10038.
- 635 28. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis**
636 **program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95–98.
- 637 29. R Development Core Team: *R: A language and environment for statistical computing.* R
638 *Foundation for Statistical Computing.* Vienna, Austria: 2011.
- 639 30. Gouy M, Guindon S, Gascuel O: **SeaView version 4: A multiplatform graphical user**
640 **interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Mol Biol Evol* 2010,
641 **27**:221–224.
- 642 31. Cacciò SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric RR, Slemenda SB,
643 Pieniazek NJ: **Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli***
644 **from naturally infected European dogs.** *Vet Parasitol* 2002, **106**:285–292.
- 645 32. Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T: ***Babesia canis***
646 ***canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means**
647 **of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease.** *Vet Parasitol*
648 2008, **157**:211–221.
- 649 33. Jefferies R, Ryan UM, Muhlnickel CJ, Irwin PJ: **Two species of canine *Babesia* in**
650 **Australia: detection and characterization by PCR.** *J. Parasitol* 2003, **89**:409–412.
- 651 34. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier P-E, Sotto A, Labauge P, Raoult
652 D: **Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses.** *PLoS*
653 *Negl Trop Dis* 2008, **2**:e338.

35. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L: ***Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission.** *Vet Res* 2009, **40**:37.
36. Cassini R, Zanutto S, Frangipane di Regalbono A, Gabrielli S, Calderini P, Moretti A, Tampieri MP, Pietrobelli M: **Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts.** *Vet Parasitol* 2009, **165**:30–35.
37. Iori A, Gabrielli S, Calderini P, Moretti A, Pietrobelli M, Tampieri MP, Galuppi R, Cancrini G: **Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy.** *Vet Parasitol* 2010, **170**: 291-296.
38. Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB: **Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America.** *Acta Trop* 2011, **117**:51–55.
39. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC: **Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects.** *Vet Parasitol* 2003, **113**:189–201.
40. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, Chatsiriwech J, Suksai P, Suwannachat P, Sariya L, Buddhirongawatr R, Charoonrut P, Chaichoun K: **Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009, **40**:35–39.

Additional files

Additional file 1: *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* 16S and 12S rDNA-mt sequences used for phylogenetic analyses

GenBank acc. N°	Species ¹	Gene	Geographical origin	Source ²	References ³
EU346682	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Porto Velho, Brazil		
GU553075	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Brazil		Moraes-Filho et al., 2011
EU346685	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Mossoro, Brazil		
GU553076	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Colombia	<i>Canis familiaris</i>	Moraes-Filho et al., 2011
DQ093297	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Tapei, Taiwan		
DQ016293	<i>R. sanguineus</i> group	16S DNAr-mt	Thailand		
GU553079	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	South Africa		Moraes-Filho et al., 2011
GU553083	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Italy		Moraes-Filho et al., 2011
Z97884	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Spain	Laboratory colony	Mangold et al., 1998
GU553081	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Spain		Moraes-Filho et al., 2011
GU553077	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Chile	<i>Canis familiaris</i>	Moraes-Filho et al., 2011
GU553078	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Santa Fe, Argentina	<i>Canis familiaris</i>	Moraes-Filho et al., 2011
GU553084	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Montevideo, Uruguay	<i>Canis familiaris</i>	Moraes-Filho et al., 2011
JQ362399 - JQ362409 *	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Gard, France	<i>Canis familiaris</i>	René et al., 2012
JX304684 - JX304691 *	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Gard, France	<i>Canis familiaris</i>	present study
JX304692 - JX304694 *	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Gard, France	environment	present study
JX304695 - JX304708 *	<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Corsica, France	<i>Canis familiaris</i>	present study
GU553080	<i>R. turanicus</i>	16S DNAr-mt	South Africa		Moraes-Filho et al., 2011
Z97885	<i>R. turanicus</i>	16S DNAr-mt	Spain	Laboratory colony	Mangold et al., 1998
GU553082	<i>R. turanicus</i>	16S DNAr-mt	Spain		Moraes-Filho et al., 2011
AY987377	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Thailand		
AY559842	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	São Paulo, Brazil	<i>Canis familiaris</i> / colony	Szabo et al., 2005
DQ003001	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Taiwan & Kinmen island		
AY947467	<i>R. sanguineus</i> group	12S DNAr-mt	Corsica	<i>Canis familiaris</i>	
AF483224	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Luganese, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
AF483227	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Gentilino, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
AF483228	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Lamone, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
FJ536526	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Portugal	<i>Ovis aries</i>	
FJ536544	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	
FJ536554	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	
AF133056	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Cairo, Egypt	Laboratory colony	Murrel et al., 2000
AY559841	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Santa Fe, Argentina	<i>Canis familiaris</i> / colony	Szabo et al. 2005
AF150020	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	France	<i>Canis familiaris</i>	Beati & Keirans, 2001
AY559843	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Uruguay		Szabo et al., 2004
HM014443	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Los Angeles, USA	<i>Canis familiaris</i>	
JX304709 - JX304727 *	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Gard, France	<i>Canis familiaris</i>	present study
JX304728 - JX304730 *	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Gard, France	environment	present study
JX304731 - JX304744 *	<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Corsica, France	<i>Canis familiaris</i>	present study
DQ901290	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Livingstone, Zambia		
DQ849232	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Livingstone, Zambia		
AF150017	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Zimbabwe	<i>Capra hircus</i>	Beati & Keirans, 2001
FJ536579	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Uzbekistan	<i>Ovis aries</i>	
FJ536578	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Kyrgyzstan		
AF150013	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Israel		Beati & Keirans, 2001
AF483252	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Arzo, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
AF483253	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Novazzano, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
AF483264	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Monte Bisbino, Switzerland	<i>Canis familiaris</i>	Bernasconi et al., 2002
AF150018	<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	France	<i>Equus caballus</i>	Beati and Keirans, 2001
AF081829	<i>R. sanguineus</i>	Complete DNAr-mt	Oklahoma, USA		Black IV & Roehrdanz, 1998

¹ Species name as indicated in GenBank² Source was only indicated if it is clearly given in GenBank or publications³ References were only indicated for published articles

* Sequences from Gard and Corsica as indicated in Figures 4 and 5

679 Additional file 2: *Babesia vogeli* 18S rDNA sequences used for phylogenetic analysis

Genbank acc. N°	Geographical origin	Source ¹	References ²
HM590440	Guangdong Province, China	<i>Canis familiaris</i>	
HQ662635	Romania	<i>Canis familiaris</i>	
JF461252	Bucharest area, Romania	<i>Canis familiaris</i>	Ionita et al., 2012
AY371197	Egypt		Passos et al., 2005
EF597562	Tunisia	<i>Canis familiaris</i>	M'ghirbi & Bouattour, 2008
EF597563	Tunisia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	M'ghirbi & Bouattour, 2008
AM183216	Istanbul, Turkey	<i>Canis familiaris</i>	Gulanber et al., 2006
GQ214514	Brazil	<i>Canis familiaris</i>	
AY371194	Lavras, Minas Gerais, Brazil	<i>Canis familiaris</i>	Passos et al., 2005
AF548006	South-Africa	<i>Canis familiaris</i>	Matjila et al., 2004
AB303076	Nigeria	<i>Canis familiaris</i>	Sasaki et al., 2007
AY102163	Northern Territory, Australia	<i>Canis familiaris</i>	Jefferies et al., 2003
AB083374	Okinawa, Japan	<i>Canis familiaris</i>	Arai et al., 1998
HQ148663	Tainan, Taiwan	<i>Canis familiaris</i>	
AY072925	Nantes area, France	<i>Canis familiaris</i>	Caccio et al., 2002
DQ439545	Spain	<i>Canis familiaris</i>	Criado-Fornelio et al., 2007
AY371198	USA	<i>Canis familiaris</i>	Passos et al., 2005
FJ200218	Croatia	<i>Canis familiaris</i>	Beck et al., 2009
EU362994	Buenos Aires, Argentina	<i>Canis familiaris</i>	Eiras et al., 2008
EU711065	Italy	<i>Canis familiaris</i>	Solano-Gallego et al., 2008
HQ718678	Hong-Kong	<i>Canis familiaris</i>	
DQ297390	Venezuela	<i>Canis familiaris</i>	Rey-Valeiron et al., 2007
JN713120 - JN713122 *	Gard, France	<i>Canis familiaris</i>	René et al., 2012
JX304677; JX304679 - JX304683 *	Gard, France	<i>Canis familiaris</i>	present study

¹ Source was only indicated if it is clearly given in GenBank or publications

² References were only indicated for published articles

* Sequences from Gard as indicated in Figures 6

3. Conclusion

Cette nouvelle étude a permis de détecter dans des échantillons de sang de chiens du Sud de la France trois espèces de piroplasmes, *B. vogeli*, *B. canis*, et *T. Annae*, avec des prévalences de 13,6%, 12,9% et 0,7% respectivement, et dans les tiques *R. sanguineus* deux espèces de piroplasmes *B. vogeli* et *B. canis*, avec des prévalences de 10,7% et 1,7% respectivement.

La distribution géographique des cas de babésiose canine, toutes espèces confondues, confirme l'existence d'un plus grand nombre de cas dans l'Ouest du bassin méditerranéen (Gard inclus) que dans l'Est (représenté par la Corse). Une différence significative a pu être démontrée entre la prévalence d'infection (chiens et tiques) par le pathogène *B. vogeli* entre le Gard et la Corse. Nos résultats mettent en évidence la circulation dans l'Ouest du bassin méditerranéen des deux espèces de piroplasmes *B. canis* et *B. vogeli* alors que la détection d'un seul cas d'infection par *T. annae* ne permet pas de conclure pour cette espèce. L'enquête réalisée a confirmé l'existence d'un foyer d'infection par le pathogène *B. vogeli* dans le département du Gard par la détection d'un plus grand nombre de cas. L'analyse conjointe de la chronologie de l'apparition des cas de babésioses canines à *B. vogeli* et de l'activité des vecteurs dans ce département ainsi que la détection de l'agent pathogène dans des échantillons de tiques non gorgées récoltées dans l'environnement confortent de nouveau l'hypothèse du rôle vecteur de *R. sanguineus* pour ce pathogène dans cette région.

Par l'analyse génétique des tiques *R. sanguineus* du Gard et de la Corse nous avons pu (i) vérifier l'identification morphologique de nos spécimens et leur affiliation à l'espèce *R. sanguineus* s.s., (ii) caractériser de façon plus précise les espèces présentes sur les territoires français, et (iii) démontrer le rapprochement des *R. sanguineus* du Gard et de Corse des espèces dites « tempérées ». Cette analyse génétique n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les tiques *R. sanguineus* du Gard et de Corse sur les fragments de gènes ADNr 12S et 16S mitochondriaux étudiés. L'utilisation d'autres méthodes génétiques plus discriminantes à l'échelle infra-spécifique, telles que les microsatellites par exemple, pourra être envisagée à l'avenir pour confirmer ou infirmer ces observations. L'analyse phylogénétique des séquences de *B. vogeli* obtenues au cours de cette étude et leur comparaison avec des séquences de *B. vogeli* de différentes origines géographiques issues de GenBank confirme l'affiliation de l'agent pathogène détecté dans le Sud de la France à l'espèce *B. vogeli* et suggère la circulation possible de plusieurs souches différentes de ce pathogène sur la planète. Enfin l'analyse phylogéographique conjointe de séquences de *R.*

sanguineus et de *B. vogeli* de différentes origines géographiques met en avant l'existence possible d'une coévolution entre l'agent pathogène et le vecteur.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis : (i) d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie de la babésiose canine dans le Sud de la France, (ii) de mieux caractériser sur le plan génétique les tiques *R. sanguineus* présentes dans cette région, et (iii) de mettre en évidence, par une analyse phylogéographique à l'échelle mondiale, l'existence possible d'une coévolution entre le pathogène *B. vogeli* et le vecteur *R. sanguineus*. Ces recherches devront être poursuivies afin de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie et la distribution spatiale et temporelle des agents de babésioses, notamment dans les territoires dans lesquels plusieurs espèces de piroplasmes et plusieurs vecteurs sont susceptibles de coexister. *In fine*, ces observations pourraient permettre d'expliquer les échecs thérapeutiques et vaccinaux observés sur le terrain et de mieux adapter les mesures prophylactiques et thérapeutiques actuellement disponibles. Enfin, nos résultats supportent l'existence d'au moins deux groupes d'espèces ou sous-espèces de *R. sanguineus* sur la planète. Pour chacune d'elle, la compétence vectorielle vis-à-vis des agents pathogènes qu'elles sont susceptibles de transmettre devra être évaluée dans le futur.

**Chapitre 4 : Etude du portage de bactéries *Anaplasmataceae* des
tiques *Rhipicephalus sanguineus* s.l. et des chiens dans le Sud de la
France**

1. Introduction

L'étude des communautés parasitaires et microbiennes au sein des arthropodes vecteurs est un axe de recherche prometteur pour la lutte anti-vectorielle (LAV). Bien que les traits d'adaptation des organismes reposent en général sur des bases génétiques, il est maintenant démontré que les microorganismes présents chez certains arthropodes peuvent interférer sur les fonctions clefs comme la reproduction, la survie ou encore la compétence vectorielle (Abdul-Ghani et al., 2012). Parmi les communautés bactériennes identifiées chez les arthropodes, les bactéries endosymbiotiques du genre *Wolbachia* sont souvent présentées comme de bons candidats pour la LAV du fait de leur capacité à moduler la reproduction des moustiques (Brelsfoard et al., 2008). D'autre part, des essais d'infections expérimentales d'*Aedes aegypti* par des bactéries *Wolbachia* se sont traduits par (i) une diminution de la durée de vie des vecteurs et (ii) une inhibition du développement, de la réplication et de la dissémination des virus de la dengue et du chikungunya (Bian et al., 2010 ; Moreira et al., 2009 ; Mousson et al., 2012). Les tiques sont capables d'héberger, comme les moustiques, plusieurs genres de bactéries endosymbiotiques (*Rickettsia*, *Coxiella*, *Midichloria*, *Diplorickettsia*, *Wolbachia* ou « *Wolbachia*-like ») (Noda et al., 1997; Plantard et al., 2012). La présence d'ADN de *Wolbachia* a été mise en évidence chez les tiques de l'espèce *R. sanguineus* (Foongladda et al., 2011) sans que la prévalence de ces infections ne soit clairement établie. De plus, les éventuelles répercussions de ces infections sur la reproduction, la survie des vecteurs et/ou la transmission d'agents pathogènes restent incertaines.

La famille des *Anaplasmataceae* appartient à l'ordre des *Rickettsiales* et à l'embranchement des *Protéobactéries* (classe des *Alphaprotéobactéries*). Elle regroupe des bactéries à localisation intracellulaire obligatoire appartenant aux genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* (Dumler et al., 2001). Parmi les membres de cette famille, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* et *Anaplasma phagocytophilum* sont des bactéries pathogènes pour le chien. *Ehrlichia canis* et *Anaplasma phagocytophilum* présentent en outre un caractère zoonotique (Little, 2010). *Ehrlichia canis* est transmis par les tiques *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2008). *R. sanguineus* est également le principal vecteur suspecté d'*A. platys* au chien sans que la compétence vectorielle de ces tiques pour cette bactérie n'ait pu être démontrée (Dyachenko et al., 2012 ; Götsch et al., 2009 ; Simpson et al., 1991).

Sur le plan clinique, l'infection du chien par *E. canis* peut se traduire par une grande variété de symptômes parmi lesquels les plus fréquemment rencontrés sont de la fièvre, de l'apathie, de l'anorexie, des myalgies, une splénomégalie, une lymphadénopathie et des troubles de l'hémostase (Little, 2010). L'infection du chien par *A. platys* induit une

thrombopénie récurrente pouvant rester inaperçue ou se manifester par des symptômes dominés le plus souvent par des phénomènes hémorragiques (Little, 2010). Des co-infections par *E. canis* et *A. platys* sont possibles et conduisent généralement à des atteintes plus graves (Gaunt et al., 2010).

L'ehrlichiose canine est une maladie endémique dans le Sud de l'Europe et le Sud de la France (Beugnet et Marié, 2009; Drouffe, 2007). Les infections de chiens par *A. platys*, sont quant à elles, plus anecdotiques. Elles ont été mises en évidence dans différents pays du bassin méditerranéen dont l'Italie, la France, l'Espagne, le Portugal, la Turquie et la Grèce (Beaufils et al., 2002; Dyachenko et al., 2012). En France, en 2001-2002, l'analyse par PCR d'échantillons de sang de chiens et de tiques récoltés dans le Sud du pays avait estimé la prévalence d'infection par des pathogènes des genres *Anaplasma* ou *Ehrlichia* à 0,15% chez les chiens et 19% chez les tiques *R. sanguineus* (Beugnet et Marié, 2009). En 2006-2007, une enquête épidémiologique basée sur la réponse à un questionnaire proposé à des vétérinaires, avance une prévalence moyenne des cas d'ehrlichiose canine en France de 2,1 pour mille. Les résultats de cette enquête suggèrent que la zone d'enzootie de la maladie puisse couvrir une grande partie Sud du territoire dont la Corse (Drouffe, 2007). Enfin, en 2006, 919 sérums de chiens issus de toute la France ont été analysés à l'aide du test Snap® 4Dx®, test rapide permettant la recherche d'anticorps anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Anaplasma* sp., anti-*Borrelia burgdorferi* et d'antigènes de *Dirofilaria immitis*. Ces analyses ont permis d'estimer une séroprévalence moyenne de 2,72% et 0,33% pour les anticorps anti-*Anaplasma* sp. et anti-*E. canis* respectivement, dans la population de chiens étudiée (Pantchev et al., 2009).

Ainsi, en France, les connaissances sur la prévalence de l'infection des chiens et des tiques *R. sanguineus* par les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* sont limitées tout comme l'importance des co-infections impliquant des piroplasmes et ces bactéries chez les chiens et les vecteurs. Par ailleurs, notre étude a permis de mettre en évidence une prévalence significativement supérieure d'infection par *B. vogeli* (chez les chiens et les tiques) dans le Gard par rapport à la Corse alors qu'aucune différence génétique n'a pu être mise en évidence entre les tiques *R. sanguineus* dans ces deux régions. Chez les moustiques, il a été montré que les co-infections de microorganismes au sein des vecteurs pouvaient se traduire de manières très différentes en fonction des cas et des situations. Dans certains cas, des phénomènes de coopérations sont constatés. L'infection d'Anophèles par des bactéries *Wolbachia* en conditions naturelles, par exemple, se manifeste par une augmentation de la longévité des vecteurs et par conséquent un risque accru d'entretien et de transmission du paludisme dans les régions où les vecteurs sont co-infectés (Zélé F. et al., 2012) Dans d'autres cas, les

interactions peuvent être antagonistes. Ainsi, certaines souches de *Wolbachia* sont capables de limiter l'infection du moustique vecteur *Aedes aegypti* par les virus de la dengue et du chikungunya (Moreira et al., 2009). Ces phénomènes, encore méconnus chez les tiques vectrices, restent à explorer.

Aussi, cette dernière partie de nos travaux a t'elle été abordée selon trois axes. Le premier axe a consisté à évaluer l'importance des infections de chiens par les *Anaplasmataceae* grâce à l'analyse sérologique (test Snap® 4Dx®) et l'analyse PCR de sangs de chiens issus des trois régions, Sud Drôme, Gard et Corse, sélectionnées pour leurs fortes infestations par les tiques *R. sanguineus*. Pour cela, une PCR généraliste permettant la détection des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* a été employée et une PCR multiplexe permettant la détection spécifique des agents pathogènes *A. platys*, *A. phagocytophilum* et *E. canis* a été développée. Le second axe de ce travail a cherché à estimer, de manière similaire, la prévalence du portage en ADN de bactéries *Anaplasmataceae* et en agents pathogènes *A. platys*, *A. phagocytophilum* et *E. canis* chez les tiques *R. sanguineus* récoltées dans ces trois régions. Une analyse statistique des résultats a permis de comparer les occurrences observées dans les trois régions étudiées. Enfin, le dernier axe s'est intéressé à évaluer la prévalence des co-infections (*B. vogeli* - *Anaplasmataceae*) dans le sang de chiens et les vecteurs récoltés au cours de notre étude. Pour cela, tous les échantillons, sangs et tiques, ayant donné un résultat positif en PCR spécifique *Babesia vogeli* au cours des précédentes étapes de ce travail ont été analysés pour la recherche de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. Comme précédemment, les ADN extraits de sangs de chiens et de tiques ont été analysés par PCR (généraliste et spécifiques) et les sérums à l'aide du test Snap® 4Dx®.

2. Méthodologie

2.1. Sérologie

Les sérums de chiens, obtenus après centrifugation des sangs récoltés sur tube sec, ont été analysés à l'aide du test Snap® 4Dx® (Laboratoires IDEXX, inc. Westbrook, Maine, Etats-Unis) conformément aux recommandations du fournisseur. Ce test utilise la technologie ELISA dont le principe général est présenté en Annexe 3. Il permet de mettre en évidence, dans le sang de chiens, la présence d'anticorps anti-*Anaplasma* sp. (*A. phagocytophilum* et *A. platys*), anti-*Borrelia burgdorferi* (agent de la maladie de Lyme), anti-*Ehrlichia canis* et la présence d'antigènes de *Dirofilaria immitis* (helminthe agent de la dirofilariose cardiaque

chez les carnivores). Les résultats sont obtenus après 8 minutes de migration à température ambiante. La visualisation du contrôle positif permet de valider le test (Figure 21). L'apparition d'une coloration bleue à l'endroit attendu pour chacun des agents recherchés permet de confirmer la positivité de l'échantillon.

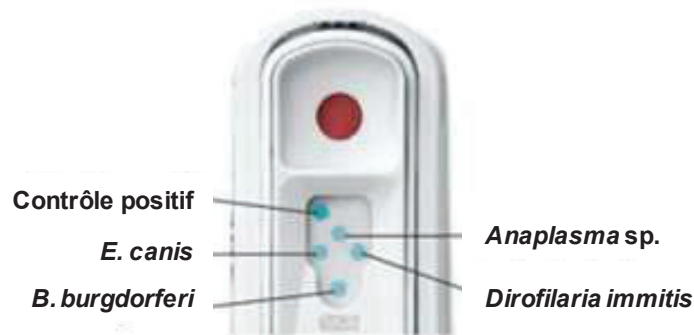


Figure 21 : Représentation d'un test Snap® 4Dx® positif pour tous les agents bactériens ou parasitaires recherchés (image Laboratoires IDEXX).

2.2. Amplification par PCR de l'ADN des *Anaplasmataceae*

Tous les ADN extraits des échantillons de sang de chiens (N=110) et des tiques *R. sanguineus* (N=242) récoltés dans les départements de la Drôme, du Gard et en Corse ont été utilisés pour la recherche des agents pathogènes décrits dans cette partie. Toutes les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur (Biometra® T gradient, Goettingen, Allemagne). Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse (130V pendant 1h) sur un gel d'agarose à 1,5% coloré au Bromure d'Ethidium puis révélés sous lampe ultra-violet.

2.2.1. PCR généraliste pour la détection des *Anaplasmataceae*

Une PCR généraliste, précédemment publiée permettant la détection de l'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* (anciennement *Ehrlichiae*) a été utilisée afin de sélectionner les échantillons porteurs de bactéries de cette famille (Parola et al., 2000). Chaque réaction a été conduite dans un volume final de 25 µL dans lequel ont été déposés 30 ng d'ADN total, 10 pmol de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP et 0,625 U de Hotstartaq ADN polymérase (Qiagen, Hilden, Allemagne) dans le tampon de réaction fourni par le laboratoire producteur (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les conditions suivantes ont été utilisées : 15 min à 95 °C; 35 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 55 °C et 1 min à 72 °C et 10 min à 72 °C. Un témoin négatif (Mix) et un témoin positif (ADN d'*Anaplasma platys* extrait du

sang d'un chien infecté) ont été inclus dans chaque expérience. Pour cela, un couple d'amorces (EHR 16SD et EHR 16SR) permettant l'amplification d'un fragment d'environ 345 paires de bases du gène de l'ARNr 16S a été utilisé (Tableau 9).

2.2.2. Détection spécifique d' *A. phagocytophilum*, *A. platys* et *E. canis*

Tous les échantillons positifs (tiques et sangs) en PCR *Anaplasmataceae* ont, par la suite, été analysés à l'aide de PCR multiplexe, développée pour la recherche des co-infections par certains des agents pathogènes transmis par les tiques dans le sang de chien (Chêne et al., manuscrit en préparation). Cette PCR multiplexe permet notamment l'identification spécifique de l'ADN du chien et des agents pathogènes *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys* et *Ehrlichia canis* (Figure 22). Chaque réaction a été conduite dans un volume final de 25 µL dans lequel ont été déposés 30 ng d'ADN total, 5 pmol de chaque amorce, 12,5 µL de Type-it Multiplex PCR Master Mix 2x (Type-it® microsatellite PCR Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) et 9 µL d'eau (RNase-free). Les couples d'amorce utilisés dans cette PCR sont présentés dans le Tableau 9. Un témoin négatif (Mix) et un témoin positif (mélange d'ADN de chien, d'*E. canis*, d'*A. platys* et d'*A. phagocytophilum* issus de cultures ou de sang de chiens infectés) ont été inclus dans chaque expérience. La spécificité des amorces utilisées dans cette PCR multiplexe a été préalablement démontrée vis-à-vis de plusieurs espèces de Protéobactéries (Beall et al., 2008, Criado-Fornelio et al. 2003, Kledmanee et al., 2009). Il a été également démontré que cette méthode n'amplifiait pas l'ADN des bactéries du genre *Wolbachia* et *Rickettsia conorii* (Chêne et al., manuscrit en préparation).

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection généraliste et spécifique des *Anaplasmataceae*.

Gène ciblé	Famille ou espèce ciblées par la PCR	Nom	Amorce	Longueur du fragment	Référence
Gène ARNr 16S	<i>Anaplasmataceae</i>	EHR 16SD ² EHR 16SR	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	345 pb ¹	Parola et al., 2000
Gène de la mitosine du chien	<i>Canis familiaris</i>	CAN-F ³ CAN-R	5'-CTTGTCACGGTAAGGTTC-3' 5'-CTGATGTATTTCCTGCACCAAG-3'	290 pb	Criado-Fornelio et al. 2003a
Gène virB9	<i>Ehrlichia canis</i>	Ehr1401F ³ Ehr1780R	5'-CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTACAA-3' 5'-TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCTAG-3'	380 pb	Kledmanee et al., 2009
Gène GroEL	<i>Anaplasma platys</i>	GroAplatys-35s ³ GroAplatys-550as	5'-AGCGTAGTCCGATTCTCCAGTTTT-3' 5'-TCGCCGTTAGCAGAGATGGTAG-3'	515 pb	Beall et al., 2008
Gène ankA	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	AnkAP-2074s ³ AnkAP-2815as	5'-GGCAAATGAGGCAAGTAACC-3' 5'-GCCACTACCCAAGGATGATAGG-3'	741 pb	Beall et al., 2008

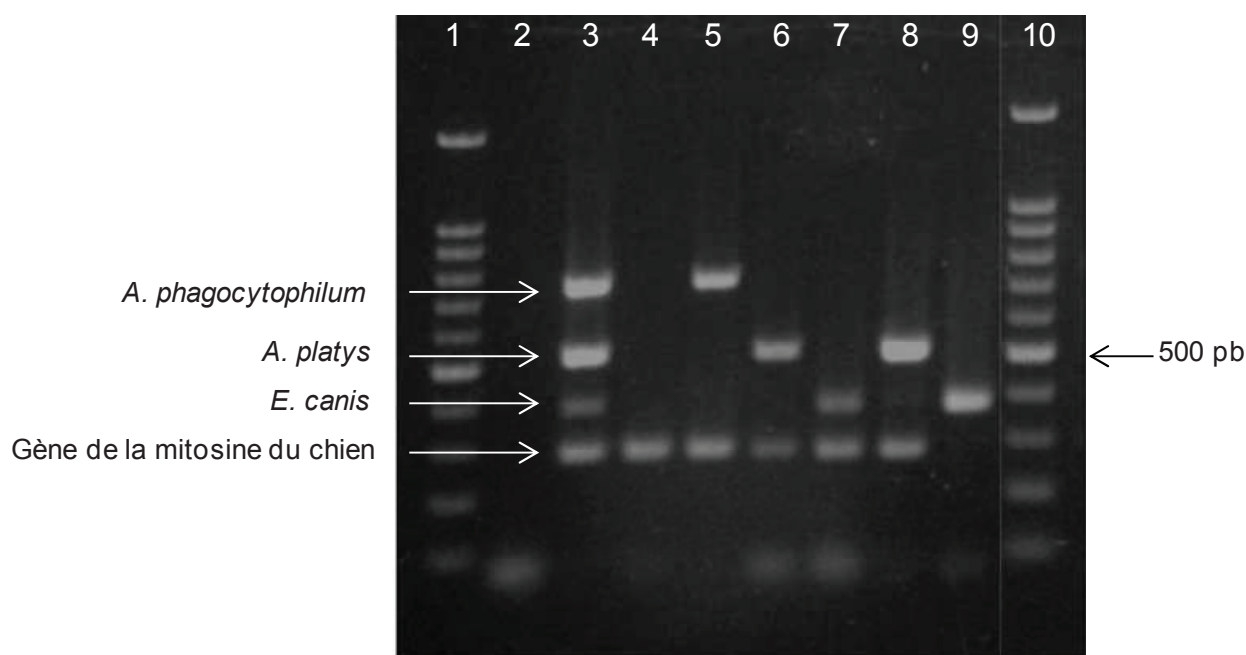
¹ pb : Paires de bases² Couple d'amorces utilisé pour la détection généraliste des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*³ Couples d'amorces utilisés pour la détection spécifique d'ADN de chien et d'agents pathogènes dans la PCR multiplexe

Figure 22 : Détection par PCR multiplexe des agents pathogènes *E. canis*, *A. platys* et *A. phagocytophilum* dans le sang de chiens infectés. Marqueurs de poids moléculaires : 100-pb (puits 1 et 10) ; Témoin négatif : mix sans ADN (puits 2) ; Témoin positif : mélange d'ADN (puits 3) ; ADN extrait de sang de chien non infecté (puits 4) ; sangs de chiens infectés par *A. phagocytophilum* (puits 5), par *A. platys* (puits 6), par *E. canis* (puits 7), par *A. platys* et *E. canis* (puits 8) ; ADN extrait d'une culture d'*E. canis* (puits 9).

2.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2011). La prévalence de l'infection par les différents organismes recherchés a été estimée en calculant le ratio du nombre d'échantillons positifs sur le nombre total d'échantillons analysés. Les résultats obtenus dans le Gard, la Corse et la Drôme ont été comparés à l'aide d'un test du chi2 en évaluant p à partir de 200 répliquas de 10000 simulations de Monté Carlo afin d'évaluer la variabilité des résultats. La valeur la plus élevée de p a alors été choisie. Une différence a été qualifiée de significative lorsque la valeur de p estimée était inférieure à 0,05.

3. Résultats

3.1. Analyse des sangs et des tiques *R. sanguineus* de Drôme, du Gard et de Corse

3.1.1. Résultats des tests Snap® 4Dx® sur sérums de chiens

Soixante-quatre sérums issus de sangs de chiens récoltés dans le Sud de la Drôme, le Gard et la Corse ont été analysés à l'aide de tests Snap® 4Dx®. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Snap® 4Dx® sur sérums de chiens de Drôme, Gard et Corse.

Région	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>E. canis</i>	<i>B. borgdorferi</i>	<i>D. immitis</i>
Drôme	2/12 (16,7%)	0/12 (0,0%)	0/12 (0,0%)	0/12 (0,0%)
Gard	0/35 (0,0%)	0/35 (0,0%)	0/35 (0,0%)	0/35 (0,0%)
Corse ¹	2/17 (11,8%) ²	6/17 (35,3%)	0/17 (0,0%)	1/17 (5,9%)
Total	4/64 (6,3%)	6/64 (9,4%)	0/64 (0,0%)	1/64 (1,6%)

¹ Tous les sangs ayant donné un résultat sérologique positif *Anaplasma* sp. et *E. canis* de Corse ont été récoltés dans un seul chenil (région de Bastia)

² Les deux chiens présentaient des anticorps anti-*Anaplasma* sp et des anticorps anti-*E. canis*

Ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*E. canis*, anti-*Anaplasma* sp. et de détecter des antigènes de *D. immitis* respectivement dans 6/64 (9,4%), 4/64 (6,3%) et 1/64 (1,6%) des sérums testés au total. Dans le Gard, les 35 sérums de chiens testés ont tous donné un résultat négatif. En Corse, sur les 17 sérums analysés, quatre ont donné un résultat positif à *E. canis* seul, deux à *E. canis* et *Anaplasma* sp. et un à *D.*

immitis. Tous les chiens porteurs d'anticorps anti-*Ehrlichia* et anti-*Anaplasma* de Corse étaient originaires d'un même chenil dans la région de Bastia.

3.1.2. Résultats des analyses PCR des sangs de chiens et des tiques

Les résultats de l'analyse PCR pour la recherche de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et des PCR spécifiques *A. platys*, *A. phagocytophilum* et *E. canis* sur les ADN extraits des échantillons de sangs de chiens et des tiques *R. sanguineus* récoltés dans les départements de la Drôme, du Gard et de Corse sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats de l'analyse PCR *Anaplasmataceae* des sangs de chiens et des tiques *R. sanguineus* de Drôme, Gard et Corse.

Organisme	Echantillon	Gard ¹	Corse ¹	Drôme ¹	Analyse statistique
<i>Anaplasmataceae</i>	Sangs	2/49 (4,1%)	2/36 (5,6%)	5/25 (20,0%)	p = 0,046
	Tiques	16/121 (13,2%)	6/65 (9,2%)	4/56 (7,1%)	p = 0,44
<i>A. platys</i>	Sangs	2/49 (4,1%) ³	0/36 (0,0%)	3/25 (12,0%) ²	p = 0,10
	Tiques	2/121 (1,7%)	0/65 (0,0%)	0/56 (0,0%)	p = 0,51
<i>E. canis</i>	Sangs	0/49 (0,0%)	1/36 (2,8%) ⁴	0/25 (0,0%)	p = 0,56
	Tiques	0/121 (0,0%)	0/65 (0,0%)	0/56 (0,0%)	–
<i>A. phagocytophilum</i>	Sangs	0/49 (0,0%)	0/36 (0,0%)	0/25 (0,0%)	–
	Tiques	0/121 (0,0%)	0/65 (0,0%)	0/56 (0,0%)	–
<i>B. vogeli</i> (rappel des résultats)	Sangs	12/49 (24,5%)	0/36 (0,0%)	3/25 (12,0%)	p ≤ 0.005
	Tiques	20/121 (16,5%)	3/65 (4,6%)	3/56 (5,4%)	p < 0.02

¹ N échantillons positifs en PCR / N échantillons analysés (%)

² Deux de ces échantillons étaient également positifs *Anaplasma* sp. au test Snap® 4Dx®.

³ Les deux échantillons ont donné un résultat négatif au test Snap® 4Dx®.

⁴ l'échantillon a donné un résultat positif à *E. canis* au test Snap® 4Dx®.

L'analyse PCR des échantillons de sang de chiens a permis de mettre en évidence la présence d'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans 9/110 échantillons (8,2%) dans les trois régions étudiées. Les PCR spécifiques ont confirmé la présence d'ADN d'*A. platys* et d'*E. canis* respectivement dans 5/110 (4,5%) et 1/110 (0,9%) de ces échantillons. Trois échantillons de sang positifs en PCR *Anaplasmataceae* ont donné des résultats négatifs aux PCR spécifiques pour les agents pathogènes recherchés. Les chiens *A. platys* positifs étaient tous originaires du Gard et de la Drôme alors que le chien infecté par *E.*

canis a été détecté en Corse (région de Bastia). Aucun échantillon sanguin n'a été détecté positif à *A. phagocytophilum*.

L'analyse des tiques a permis de mettre en évidence la présence d'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans 26/242 (10,7%) tiques *R. sanguineus* dans les trois régions étudiées. Les PCR spécifiques ont confirmé la présence d'ADN d'*A. platys* dans 2/242 (0,8%) de ces échantillons. Vingt-quatre échantillons positifs en PCR *Anaplasmataceae* ont donné des résultats négatifs en PCR spécifiques pour les agents pathogènes recherchés. Parmi les 26 tiques positives en PCR *Anaplasmataceae*, 13 ont été retirées sur des chiens négatifs, 10 sur des chiens dont le statut n'est pas connu (absence de prélèvements de sang), une sur un chien positif pour *A. platys* alors que 2 ont été récoltées dans l'environnement dans le département du Gard. Les 2 tiques positives à *A. platys* ont été récoltées dans le département du Gard sur 2 chiens dont l'un a donné un résultat négatif en PCR *Anaplasmataceae* alors que le statut de l'autre n'est pas connu. Aucune tique n'a été détectée porteuse d'*E. canis* et d'*A. phagocytophilum*.

Seule l'analyse statistique comparative des prévalences d'infection par les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans les échantillons de sang de chiens a mis en évidence une prévalence statistiquement plus élevée ($p < 0.05$) dans la Drôme par rapport aux autres départements. Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les prévalences d'infections par les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans les tiques que ce soit par PCR généraliste ($p = 0,44$) ou par PCR spécifique pour les agents pathogènes recherchés.

3.2. Recherche de co-infections

3.2.1. Résultats des tests Snap® 4Dx® sur sérums de chiens positifs à *B. vogeli*

Sur les 19 échantillons de sang de chiens positifs à *Babesia vogeli* détectés dans le Sud de la France au cours de cette étude, 18 ont été analysés à l'aide du test Snap® 4Dx®. Un seul de ces échantillons a donné un résultat positif à *Anaplasma* sp. Aucun test n'a donné de résultat positif à *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* et *Dirofilaria immitis*.

3.2.2. Analyses PCR des échantillons (sangs et tiques) positifs à *B. vogeli*

Les 19 ADN extraits des échantillons de sang positifs à *B. vogeli* ont été testés en PCR pour la recherche de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* complétée de PCR pour la

détection spécifique d'*A. platys*, d'*A. phagocytophilum* et d'*E. canis* en cas de positivité. Un seul échantillon a été détecté positif à *B. vogeli* et *A. platys*. Le sérum de ce chien correspond au sérum de chien *B. vogeli* positif ayant donné un résultat également positif (*Anaplasma* sp.) au test Snap® 4Dx®.

Sur les 242 ADN de tiques *R. sanguineus* analysés dans le Gard, la Corse et la Drôme, 26 avaient donné un résultat positif à la recherche de *B. vogeli*. Parmi ces 26 échantillons, un seul (0,4%), correspondant à une tique préalablement détectée porteuse de *B. vogeli* et *B. canis*, a donné un résultat positif lors de son analyse en PCR *Anaplasmataceae* puis un résultat positif en PCR spécifique *A. platys*. La tique concernée est une tique *R. sanguineus* femelle récoltée sur un chien négatif pour ces 3 agents pathogènes dans le département du Gard.

4. Discussion

Les résultats de l'analyse au test Snap® 4Dx® de 64 sérums de chiens sélectionnés pour leur exposition récente à des tiques ou la suspicion clinique d'une maladie transmise par les tiques ont permis d'évaluer une prévalence moyenne du portage en anticorps anti-*E. canis* et anti-*Anaplasma* sp., et anti-*Borrelia Burgdorferi* à 9,4%, 6,3%, et 0% respectivement dans trois régions du Sud de la France. La présence d'antigène de *D. immitis* a été constatée chez un seul des 64 chiens testés (1,6%). Les prévalences sérologiques estimées dans cette étude sont supérieures, pour la détection d'anticorps anti-*E. canis* et anti-*Anaplasma* sp., à celles évaluées lors d'une précédente enquête et donnant des valeurs de séroprévalence de 2,72% pour *Anaplasma* sp et 0,33% pour *E. canis* (Pantchev et al., 2009). Les différences observées peuvent être expliquées par un nombre et un recrutement différents des chiens testés. Notre analyse ne porte en effet que sur un nombre limité d'échantillons (N=64) et cible spécifiquement des chiens « porteurs de tiques ou suspects de maladies transmises par les tiques » résidant dans le Sud de la France. L'étude de Pantchev et collaborateurs porte sur l'analyse de 919 sérums de chiens, sans présélection préalable, issus de tout le territoire français. Dans le cas d'*E. canis*, l'estimation de la séroprévalence totale ne peut être considérée comme représentative puisque les 6 chiens présentant des anticorps contre ce pathogène ont été détectés dans un même chenil en Corse. Toutefois, ces résultats concordent avec les données précédemment obtenues donnant une prévalence élevée de l'ehrlichiose canine en Corse (Drouffe, 2007) et plus particulièrement dans la région de Bastia (87,5% d'échantillons *E. canis* positifs dans un chenil) (Trotz-Williams et Trees, 2003). Les fortes

prévalences d'infections par *E. canis* constatées dans des chenils ne sont pas surprenantes si l'on tient compte de la forte prolificité parfois constatée des tiques *R. sanguineus* lorsque de nombreux hôtes potentiels sont disponibles ainsi que de la transmission trans-stadiale démontrée pour cette bactérie chez ce vecteur favorisant l'entretien de l'infection lorsque hôtes et vecteurs évoluent dans des environnements confinés.

Le laboratoire producteur du test Snap® 4Dx® a montré que ce test, initialement conçu pour la détection des anticorps d'*A. phagocytophilum*, pouvait produire des réactions croisées avec *A. platys* lors d'essais réalisés sur des chiens infectés par ce pathogène (notice technique des tests Snap® 4Dx®, Laboratoires IDEXX, inc. Westbrook, Maine, Etats-Unis). Nos résultats concordent avec ces observations et supportent l'existence de réactions croisées. En effet, sur les quatre chiens présentant des anticorps anti-*Anaplasma* sp., deux étaient positifs en PCR spécifique pour la recherche d'*A. platys* alors que la PCR spécifique pour la détection du pathogène *A. phagocytophilum* réalisée sur ces mêmes prélèvements a donné un résultat négatif. Toutefois, compte tenu de la chronologie différente de la détection de l'ADN des agents pathogènes par PCR et de l'apparition des anticorps dans le sang (souvent différée), ces résultats ne permettent pas de conclure avec certitude.

Les résultats des analyses PCR pour la détection des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* ont permis de confirmer la présence de bactéries de cette famille dans les échantillons de sang de chiens et les tiques *R. sanguineus* dans le Sud de la France, avec des prévalences moyennes de 8,2% et 10,7% respectivement. Les analyses PCR spécifiques pour la détection d'*A. platys*, *A. phagocytophilum* et *E. canis* ont permis d'estimer une prévalence d'infection par *A. platys* et *E. canis* de 4,5% et 0,9% respectivement chez les chiens et 0,8% et 0% respectivement chez les tiques. La détection d'ADN d'*A. platys* dans deux tiques *R. sanguineus* dont l'une a été récoltée sur un chien négatif ainsi que la circulation confirmée (par sérologie et PCR) d'*A. platys* dans les régions étudiées (sélectionnées pour la présence soutenue des tiques *R. sanguineus* sur les chiens) soutiennent le rôle vecteur potentiel de *R. sanguineus* pour cette bactérie. De nouveaux essais expérimentaux de transmission, utilisant des vecteurs et des bactéries récoltés dans une même zone géographique, devront être engagés dans le futur pour confirmer ou infirmer la compétence vectorielle de *R. sanguineus* pour cette bactérie. Pour 3 échantillons de sang et 14 tiques, l'agent bactérien détecté par PCR généraliste n'a pas pu être identifié. Des essais de séquençage direct d'amplifiats ont été entrepris pour un certain nombre de ces échantillons mais la présence de co-infections, matérialisée par l'observation de superpositions de pics sur les chromatogrammes, a rendu leur interprétation impossible. Des clonages puis séquençage, ou encore l'utilisation de PCR

spécifiques pour la recherche d'autres bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* devraient être envisagés dans le futur. Pour certains résultats négatifs, l'hypothèse d'un défaut de sensibilité des méthodes d'analyses développées pour l'analyse de sangs et appliquées ici sur des échantillons de tiques peut être évoquée.

La recherche, dans les tiques, par PCR généraliste, d'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et l'analyse statistique de nos résultats n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les prévalences d'infections dans la Drôme, le Gard ou la Corse. Parmi les 26 échantillons de tiques *R. sanguineus* détectées positives à l'infection par *B. vogeli*, une seule co-infection (*B. canis*, *B. vogeli* et *A. platys*) a été détectée. La recherche de co-infections, chez les tiques *R. sanguineus*, par les protozoaires de l'espèce *B. vogeli* et des bactéries de la famille des *Anaplamataceae* a été engagée afin d'estimer l'importance de ces co-infections mais également d'évaluer l'impact possible de ces co-infections sur la transmission des piroplasmes. Ainsi, ces analyses n'ont pas permis d'établir de lien entre les prévalences d'infections par les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et les prévalences différentes préalablement constatées d'infections par *B. vogeli* dans le Gard et en Corse. L'identification spécifique des bactéries détectées par PCR généraliste devra être finalisée pour conclure. En particulier, la recherche spécifique de bactéries du genre *Wolbachia* devra être entreprise.

Enfin, la recherche de co-infections par des bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans les échantillons de sang de chiens positifs à *Babesia vogeli* n'a permis de mettre en évidence qu'une seule co-infection par les pathogènes *B. vogeli* et *A. platys* (supportée par un test 4Dx positif pour *Anaplasma* sp.). Cette co-infection a été détectée chez un chien asymptomatique résidant dans la Drôme. Les valeurs de l'hémogramme obtenues sur le sang de ce chien le jour du prélèvement étaient normales (aucun signe d'anémie ni de thrombopénie).

5. Conclusion

La séroprévalence du portage en anticorps anti-*Anaplasma* sp., et anti-*Borrelia burgdorferi* dans une population de chiens exposés à des tiques *R. sanguineus* dans le Sud de la France a été évaluée à 6,3%, et 0% respectivement. Un foyer d'infection par *E. canis* a été détecté en Corse dans un chenil de la région de Bastia confirmant la présence de ce pathogène dans cette région. Notre étude a permis, en outre, de mettre en évidence la présence d'ADN des agents pathogènes *A. platys* et *E. canis* respectivement dans 4,5% et 0,9% des sangs de chiens testés ainsi que dans 0,8% et 0% des tiques *R. sanguineus* analysées. Ces résultats

donnent une estimation de la prévalence de l'infection par ces agents pathogènes dans ce territoire où très peu d'informations sont actuellement disponibles. La détection d'ADN d'*A. platys* dans deux tiques *R. sanguineus* dont l'une a été récoltée sur un chien négatif ainsi que la circulation confirmée (par sérologie et PCR) d'*A. platys* dans les régions de notre étude sélectionnées pour la présence soutenue des tiques *R. sanguineus* sur les chiens,

supporte le rôle vecteur potentiel de *R. sanguineus* pour cette bactérie.

La présence de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans les vecteurs ne permet pas d'expliquer la différence de prévalence d'infection par *B. vogeli* constatée entre le Gard et la Drôme. La recherche spécifique de chacune des bactéries de cette famille dans les échantillons pour lesquels l'identification de l'espèce n'a pas pu être réalisée devra toutefois être entreprise pour compléter ces résultats et en tirer des conclusions.

Une seule co-infection a été détectée chez les chiens *B. vogeli* positifs. D'autres co-infections devront être recherchées compte du nombre d'agent pathogène transmis (ou suspect de l'être) par les tiques *R. sanguineus*. Le développement de méthodes permettant la détection de plusieurs agents pathogènes en une seule réaction devrait permettre de répondre à ces interrogations dans le futur.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

La lutte contre les maladies infectieuses représente toujours un véritable challenge dans nos sociétés modernes. Les maladies infectieuses constituent la deuxième cause de mortalité humaine et sont responsables de 40% des pertes de production agricoles (WHO, 2007). Avec le développement des transports, elles se propagent de manière plus rapide et une augmentation de l'émergence et de la ré-émergence d'agents infectieux (viraux, bactériens ou parasitaires) est constatée (WHO, 2007). Les mouvements des populations animales et humaines et les facteurs écologiques et génétiques jouent un rôle important dans cette expansion. Parmi ces maladies infectieuses, les maladies transmises par des arthropodes vecteurs occupent une part importante. Les tiques sont, avec les moustiques, les principaux vecteurs de maladies à l'homme et aux animaux sur la planète. En Europe, les tiques sont les premiers vecteurs de maladies toutes espèces confondues (Randolph, 2010) et sont responsables d'un nombre croissant de maladies humaines et animales (borrélioses de Lyme, encéphalites à tiques, babésioses, anaplasmoses, ehrlichioses et leishmanioses notamment).

Parmi les maladies transmises par les tiques aux animaux et aux carnivores en particulier, les babésioses (ou piroplasmoses), responsables d'anémies hémolytiques graves, parfois mortelles, sont endémiques dans de nombreux pays d'Europe dont la France, la Suisse, la Hongrie, la Serbie, la Croatie, le Nord de l'Italie et le Nord de l'Espagne (Beugnet et Marié, 2009). Ce sont probablement les maladies à vecteurs de carnivores les plus fréquemment rapportées par les vétérinaires sur l'ensemble du territoire français. Alors que les pays du Nord de l'Europe étaient autrefois considérés indemnes, des cas autochtones de cette maladie y sont désormais décrits (Beugnet et Marié, 2009). Le développement des méthodes moléculaires a permis de confirmer l'existence de plusieurs espèces de piroplasmes capables d'infecter le chien et de variants génétiques au sein de ces espèces. Du fait de l'utilisation encore limitée de ces méthodes, les connaissances sur la distribution de ces espèces restent succinctes. Pourtant cette connaissance est essentielle à la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et à l'évaluation, sur les souches circulantes, de l'efficacité des traitements et des vaccins actuellement disponibles.

Contribution à l'étude de l'épidémiologie de la babésiose canine dans le Sud de la France

Les connaissances sur les agents responsables de babésioses canines et le rôle vecteur potentiel des tiques *R. sanguineus* dans la transmission de cette maladie étaient peu documentés en Europe en général et en France en particulier. Cependant, plusieurs constats indiquaient la nécessité de mettre en œuvre des recherches dans ce domaine. Tout d'abord, alors qu'au moins quatre espèces de piroplasmes circulaient en Europe, peu d'informations concernant les espèces présentes en France étaient disponibles. Ensuite, des travaux signalaient la présence dans le Sud de la France de deux vecteurs potentiels de babésioses canines : *D. reticulatus* et *R. sanguineus*. Enfin, les informations fournies par les vétérinaires en exercice dans cette région rapportaient l'existence de cas de babésioses canines dans l'Ouest du bassin méditerranéen et leur quasi absence dans l'Est et en Corse. Ces constatations ont conduit mon équipe d'accueil à mettre en place une enquête épidémiologique de grande envergure. Cette enquête a permis d'actualiser les informations sur la circulation de piroplasmes dans le Sud de la France.

Les travaux menés ont mis en évidence l'infection par 3 espèces de piroplasmes, *Babesia vogeli*, *Babesia canis* et *Theileria annae*, avec des prévalences estimées respectivement à 13,6%, 12,9% et 0,7%, dans des populations de chiens exposés aux tiques dans un territoire couvrant le Sud de la Drôme (région de Montélimar), les régions Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon et la Corse. La recherche des agents pathogènes chez les tiques de l'espèce *R. sanguineus* a en outre permis de détecter de l'ADN de *B. canis* et *B. vogeli* avec des prévalences de 1,7% et 10,7%, respectivement. Un foyer de babésioses à *B. vogeli* a pu être identifié dans le département du Gard. La mise en évidence d'ADN de ce pathogène dans des tiques *R. sanguineus* récoltées à la fois sur des chiens et dans l'environnement ainsi que l'observation concomitante de cas de babésiose et de fortes infestations par ces tiques suggèrent fortement le rôle de cette tique dans la transmission de cet agent pathogène dans ce département. Enfin, la distribution géographique des cas de babésioses canines, toutes espèces confondues, confirme l'existence d'un plus grand nombre de cas dans l'Ouest du bassin méditerranéen (Gard inclus) que dans l'Est (représenté par la Corse). Une différence significative a pu être en outre démontrée entre la prévalence d'infection (chiens et tiques) par le pathogène *B. vogeli* entre le Gard et la Corse. Pour expliquer cette différence, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Une introduction et un établissement plus précoce du pathogène *B. vogeli* dans la région du Gard par rapport à la Corse se traduisant par l'existence d'un plus grand nombre de foyers d'infection dans cette

région peuvent être avancés. Cette différence pourrait également être expliquée par l'existence de populations génétiquement différentes de vecteurs dans le Sud de la France ou par d'autres facteurs capables d'influencer l'implantation ou la transmission de l'agent pathogène tels que l'existence de co-infections au sein des vecteurs ou l'influence de facteurs climatiques, écologiques et environnementaux. Parmi ces hypothèses, l'existence de populations différentes de vecteurs et de co-infections au sein des vecteurs ont été évaluées et n'ont pas permis, avec les méthodes que nous avons employées, d'expliquer les différences de prévalences observées.

Aussi les résultats de ces travaux permettent-ils d'envisager de nombreuses perspectives de recherche. Il serait intéressant dans un premier temps d'étendre le territoire d'étude à un plus grand nombre de départements afin de mieux caractériser la prévalence de l'infection par chaque espèce de piroplasma dont la présence est déjà confirmée et peut-être en détecter de nouvelles. La poursuite des investigations dans le département du Gard et la Corse nous paraît également nécessaire afin de confirmer nos observations par l'analyse d'un plus grand nombre de cas. Par ailleurs, malgré le fait que nos données suggèrent fortement l'implication de *R. sanguineus* comme espèce vectrice de *B. vogeli*, la compétence vectorielle des populations de tiques récoltées dans le Gard vis-à-vis de la souche locale de *B. vogeli* pourrait être confirmée par des essais d'infections expérimentales. Une analyse similaire réalisée dans les mêmes conditions pourrait être envisagée pour tester la compétence vectorielle de tiques *R. sanguineus* de Corse vis-à-vis de la souche « Gard » de ce pathogène. Enfin, la réalisation d'essais évaluant l'influence des facteurs environnementaux comme l'ensoleillement, la température, l'hygrométrie ou la hauteur de pluie mensuelle sur le pathosystème *R. sanguineus* / *B. vogeli* pourra être envisagée afin de mieux cerner l'influence de ces facteurs sur la capacité de transmission des vecteurs.

En Europe, il est admis que *D. reticulatus* et *R. sanguineus* sont les vecteurs principaux de *B. canis* et *B. vogeli*, respectivement (Matijatko et al., 2012; Solano-Gallego et Baneth, 2011). Toutefois, de récentes études conduites en Italie remettent en question l'étroitesse des spécificités entre pathogènes et vecteurs traditionnellement admises par la détection d'ADN de *B. canis* et la démonstration d'une transmission verticale de ce pathogène chez les tiques *R. sanguineus* (Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010). Nous avons également, dans cette étude, mis en évidence de l'ADN de *B. canis* dans 1,7% (4/242) des tiques *R. sanguineus* analysées. Nous ne pouvons que regretter le nombre limité de tiques récoltées au cours de notre étude dans les départements où des infections de chiens par les deux espèces de babésies, *B. canis* et *B. vogeli*, ont été identifiées. Là aussi en terme de perspective il serait

envisageable de réaliser des études (i) d'analyse simultanée de la chronologie de la détection de chaque espèce de piroplasma dans des sangs de chiens et de l'activité des vecteurs potentiels, et (ii) de recherche des agents pathogènes dans toutes les espèces de tiques représentées dans ces régions. Ces recherches devraient permettre de mieux évaluer le rôle vecteur potentiel de chacune des espèces de tique pour les différents agents de babésiose canine détectés sur le territoire. Enfin, si le doute persiste, la réalisation d'essais expérimentaux visant à confirmer la compétence vectorielle des tiques *D. reticulatus* et *R. sanguineus* vis-à-vis de chaque espèce de piroplasma pourra être envisagée.

Existe-t-il une coévolution entre les tiques *R. sanguineus* et les protozoaires de l'espèce *B. vogeli* ?

De récentes études suggèrent l'existence de deux populations différentes au sein des tiques *Rhipicephalus sanguineus* (De Oliveira et al., 2005; Szabó et al., 2005) distribuées de manières différentes, la première en régions tropicales, la deuxième en régions tempérées et méditerranéennes (Burlini et al., 2010; Moraes-Filho et al., 2011; Nava et al., 2012). Cependant, la caractérisation morphologique des espèces au sein des tiques *Rhipicephalus* du groupe « *sanguineus* » est basée sur un nombre de critères limité et des variations intra-spécifiques sont décrites. Ainsi, le risque d'erreur lors de la réalisation d'une identification morphologique de ces espèces est à craindre, notamment entre les espèces *Rhipicephalus turanicus* et *R. sanguineus* qui peuvent être rencontrées en sympatrie dans certaines régions. La situation est encore plus complexe par le fait que le spécimen « type » de *R. sanguineus* a été perdu (Pegram et al., 1987a, 1987b). Afin de réduire au maximum les risques d'erreurs d'identification et donc de conclusions erronées, nous avons choisi d'arrêter notre identification morphologique au groupe « *sanguineus* » puis de poursuivre la détermination des spécimens par une analyse génétique. Nous avons pu ainsi caractériser 36 échantillons de tiques *R. sanguineus* du Sud de la France sur deux gènes mitochondriaux (gènes de l'ARNr 12S et 16S). Ces caractérisations ont permis de confirmer l'affiliation des spécimens étudiés à l'espèce *R. sanguineus* s.s. et de les rapprocher génétiquement des populations des zones tempérées ou méditerranéennes.

La certitude de l'affiliation des spécimens étudiés à l'espèce *R. sanguineus* s.s. a permis d'entreprendre l'analyse phylogéographique comparative des populations de tiques et des protozoaires *B. vogeli* de diverses origines. Les résultats suggèrent un phénomène possible de coévolution entre les vecteurs et les agents pathogènes. Cependant, cette

hypothèse devra être confirmée par la réalisation d'analyses génétiques plus poussées des 4 différentes souches « hypothétiques » de *B. vogeli* identifiées. Ces analyses devront porter notamment sur l'amplification d'un plus grand nombre de gènes. De plus, la mise en place d'études standardisées visant à mieux caractériser les répercussions cliniques de l'infection de chiens par chacune de ces souches pourraient permettre d'apporter des éléments de réponse à la variabilité des symptômes observés. Si nos hypothèses sont confirmées, la mise en place d'essais d'infections - transmissions croisés, utilisant des tiques *R. sanguineus* des régions tempérées et des tiques *R. sanguineus* des régions tropicales d'une part et différentes souches de *Babesia vogeli* d'autre part, pourront être envisagées afin d'évaluer les répercussions possibles de cette coévolution sur la transmission.

Enfin, il sera essentiel à l'avenir de poursuivre la caractérisation des tiques de cette espèce afin d'acquérir de nouveaux outils permettant de mieux distinguer les espèces *R. sanguineus* s.s. et *R. turanicus*. Pour cela, des spécimens « types » de différentes origines géographiques devront être analysés au niveau moléculaire en intégrant de nouveaux marqueurs génétiques. Ces études devront également intégrer des analyses biologiques avec notamment des observations morphologiques et morphométriques approfondies ainsi que la réalisation d'essais de croisements.

Les tiques *R. sanguineus* hébergent d'autres communautés parasitaires et microbiennes

L'étude des communautés parasitaires et microbiennes au sein des arthropodes vecteurs est un axe de recherche prometteur pour la lutte anti-vectorielle. Dans une dernière partie de ce travail, nous avons commencé à évaluer les communautés microbiennes présentes au sein des vecteurs *R. sanguineus* par la recherche par PCR de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. Au sein de cette famille se trouvent (i) des bactéries pathogènes pour le chien dont certaines (*Anaplasma platys* et *Ehrlichia canis*) sont transmises ou suspectées de l'être par les tiques *R. sanguineus* et (ii) des bactéries symbiotiques (genre *Wolbachia*) connues pour leur capacité à manipuler la reproduction des arthropodes (Abdul-Ghani et al., 2012). Des bactéries du genre *Wolbachia* ont déjà été identifiées chez les tiques dont des tiques de l'espèce *R. sanguineus* (Foongladda et al., 2011). Les éventuelles répercussions de leur présence sur la biologie des tiques ou leur capacité à transmettre des agents pathogènes restent à démontrer.

Les analyses préliminaires réalisées au cours de ce travail ont mis en évidence la présence d'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* dans 10,7% (26/142) des

tiques *R. sanguineus* analysées. Les essais d'amplification spécifique réalisés par la suite n'ont permis de caractériser que 7,7% (2/26) des tiques positives à la première PCR généraliste. Dans les deux cas, il s'agissait de la bactérie *Anaplasma platys*. L'existence de co-infections ne nous a pas permis d'envisager une identification d'autres espèces bactériennes par séquençage. Ces essais devront être poursuivis afin de mieux caractériser les communautés bactériennes présentes dans les populations de tiques *R. sanguineus* étudiées. Notamment, l'utilisation d'outils sensibles et spécifiques pour la détection des bactéries au sein de la famille des *Anaplasmataceae* et de technologies de séquençage à haut débit pourrait être envisagée afin de réaliser une exploration exhaustive des symbiotes et pathogènes des tiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Ghani, R., Al-Mekhlafi, A.M., Alabsi, M.S., 2012. Microbial control of malaria: Biological warfare against the parasite and its vector. *Acta Trop.* 121, 71–84.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T., Allsopp, B.A., 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 108, 147–152.
- Ayoob, A.L., Hackner, S.G., Prittie, J., 2010. Clinical management of canine babesiosis. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 20, 77–89.
- Babeş, V., 1888. Sur l'hémoglobulinurie bactérienne du boeuf. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 107, 692–694.
- Bain, O., 1972. Recherches sur la morphogenèse des filaires chez l'hôte intermédiaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 47, 252–303.
- Bain, O., Aeschlimann, A., Chatelanat, P., 1982. Présence, chez des tiques de la région de Genève, de larves infestantes qui pourraient se rapporter à la filaire de chien *Dipetalonema grassii*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 643–646.
- Baneth, G., 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet. Parasitol.* 181, 3–11.
- Barker, S.C., Murrell, A., 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 55–68.
- Beall, M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P.V.P., Mainville, C., Hegarty, B.C., Crawford, J.M., Breitschwerdt, E.B., 2008. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 455–464.
- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48.
- Beaufils, J.P., Inokuma, H., Martin-Granel, J., Jumelle, P., Barbault-Jumelle, M., Brouqui, P., 2002. *Anaplasma platy* (*Ehrlichia platy*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Rev. Méd. Vét.* 153, 85–90.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* 39, 843–848.

- Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 115–137.
- Beugnet, F., Chalvet-Monfray, K., Loukos, H., 2009. FleaTickRisk: a meteorological model developed to monitor and predict the activity and density of three tick species and the cat flea in Europe. *Geospat. health* 4, 97–113.
- Beugnet, F., Kolasinski, M., Michelangeli, P.A., Vienne, J., Loukos, H., 2011. Mathematical modelling of the impact of climatic conditions in France on *Rhipicephalus sanguineus* tick activity and density since 1960. *Geospat. Health* 5, 255–263.
- Beugnet, F., Marié, J.L., 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298–305.
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., Xi, Z., 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 6, e1000833.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2004a. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 494–498.
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2004b. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet. Parasitol.* 124, 151–160.
- Boozer, A.L., Macintire, D.K., 2003. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 885–904.
- Bourdeau, P., 1993a. Les tiques d'importance vétérinaire et médicale. 1ère partie, principales caractéristiques morphologiques et biologiques et leurs conséquences. *Point Vet.* 25, 13–26.
- Bourdeau, P., 1993b. Les tiques d'importance vétérinaire et médicale. 2ème partie : principales espèces de tiques dures (*Ixodidae* et *Amblyommidae*). *Point Vet.* 25, 27–41.
- Bourdoiseau, G., 2006. Canine babesiosis in France. *Vet. Parasitol.* 138, 118–125.
- Bourdoiseau, G., Renard, N., 2005. Résultats d'une enquête en France sur les cas suspectés ou confirmés de babésiose chez le chien. *Nouveau Prat. Vét.* août-sept. 2005, 37–42.
- Boussarie, D., 1982. Un cas de piroplasmose avec des parasites d'un aspect particulier. *L'animal de Compagnie* 17, 597–599.
- Brelsfoard, C.L., Séchan, Y., Dobson, S.L., 2008. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e129.

- Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E.R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G.R., Jittapalapong, S., Moore, D.L., Stich, R.W., 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 131, 95–105.
- Burlini, L., Teixeira, K.R.S., Szabó, M.P.J., Famadas, K.M., 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp. Appl. Acarol.* 50, 361–374.
- Bussi  ras, J., Chermette, R., 1992. Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fasc. 2, Protozoologie vétérinaire. Informations Techniques des Services Vétérinaires - Ministère de l'Agriculture. Revue du Syndicat National des Vétérinaires Inspecteurs du Ministère de l'Agriculture.   cole nationale vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 186 pp.
- Cacci  , S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 285–292.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156, 199–204.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout,   ., Moubri, K., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 298–301.
- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165, 30–35.
- Chabanne, L., Bourdoiseau, G., Boulouis, H.-J., Beugnet, F., 2011. Les maladies vectorielles    bactéries h  motropes chez le chien, in: *Encyclopédie M  dico-Chirurgicale Vétérinaire*. Paris, France, 14 pp.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L., 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40, 37.

- Chêne, J., Massot, R., René-Martellet, M., Bourdoiseau, G., Chabanne, L., en préparation. Detection of *Rhipicephalus sanguineus* borne pathogens in dogs using Multiplex Polymerase Chain Reaction. en préparation.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73–76.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003a. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189–201.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003b. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* 114, 173–194.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R., Irwin, P., 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasitol.* 144, 261–269.
- Cruz-Vazquez, C., Garcia-Vazquez, Z., 1999. Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 277–280.
- Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152, 173–185.
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors* 3, 26.
- Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Figueredo, L.A., Otranto, D., 2010. Effects of prolonged exposure to low temperature on eggs of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 171, 327–330.
- Dantas-Torres, F., 2011. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.* 27, 155–159.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Otranto, D., 2011. Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. *Parasitology* 138, 527–536.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012a. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446.
- Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Otranto, D., 2012b. Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 185, 260–264.

- Day, M.J., 2011. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasit Vectors* 4, 49.
- De la Fuente, J., Rodríguez, M., Redondo, M., Montero, C., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Lleonart, R., De Armas, C.A., Rey, S., Rodríguez, J.L., Artiles, M., García, L., 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 16, 366–373.
- De Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Saito, K.C., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Mathias, M.I.C., 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet. Parasitol.* 129, 139–147.
- De Rose, R., McKenna, R.V., Cobon, G., Tennent, J., Zakrzewski, H., Gale, K., Wood, P.R., Scheerlinck, J.P., Willadsen, P., 1999. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 151–160.
- Demma, L.J., Ereemeeva, M., Nicholson, W.L., Traeger, M., Blau, D., Paddock, C., Levin, M., Dasch, G., Cheek, J., Swerdlow, D., McQuiston, J., 2006. An outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever associated with a novel tick vector, *Rhipicephalus sanguineus*, in Arizona, 2004: preliminary report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 342–343.
- Drouffe, A., 2007. Situation actuelle des ehrlichioses canines en France: Enquête nationale auprès des vétérinaires, Thèse d'exercice vétérinaire, ENV Nantes.
- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strasek, K., Avsic-Zupanc, T., 2004. Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35, 363–368.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H.-J., Meyersen, A., Straubinger, R.K., 2012. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasit. Vectors* 5, 49.

- ESCCAP, 2012. Control of ectoparasites in dogs and cats, ESCCAP Guidelines 03 2nd ed. European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. <http://www.esccap.org/>.
- Estrada- Peña, A., Bourdeau, P., 1998. Les tiques. Un parcours interactif dans l'univers des tiques, CD-ROM Laboratoires Virbac/Maximédia. ed.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species. University of Zaragoza, Zaragoza. 131 pp.
- Estrada-Peña, A., Farkas, R., Jaenson, T.G.T., Koenen, F., Madder, M., Pascucci, I., Salman, M., Tarrés-Call, J., Jongejan, F., 2012. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. Exp. Appl. Acarol. Impression en cours.
- Fernandes, É.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W., 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Exp. Parasitol. 130, 300–305.
- Foongladda, S., Inthawong, D., Kositanont, U., Gaywee, J., 2011. *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Bartonella* in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1335–1341.
- Fritz, D., 2010. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). Parasitol. Res. 106, 1339–1342.
- Fukata, T., Ohnishi, T., Okuda, S., Sasai, K., Baba, E., Arakawa, A., 1996. Detection of canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni* by flow cytometry. J. Parasitol. 82, 641–642.
- García, A.T.C., 2006. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. Vet. Parasitol. 138, 97–102.
- Garrett-Jones, C., Grab, B., 1964. The assessment of insecticidal impact on the malaria mosquito's vectorial capacity, from data on the proportion of parous females. Bull. World Health Organ. 31, 71–86.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E., 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit. Vectors 3, 33.
- Gilot, B., Pérez-Eid, C., 1998. Bio-écologie des tiques induisant les pathologies les plus importantes en France. Méd. Mal. Infect. 28, 325–334.
- Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L., Huxsoll, D.L., 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am. J. Vet. Res. 937–940.

- Gülanber, A., Gorenflot, A., Schetters, T.P.M., Carcy, B., 2006. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet. Parasitol.* 139, 224–230.
- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S., Pfister, K., 2009. Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 42–45.
- Harrus, S., Baneth, G., 2005. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int. J. Parasitol.* 35, 1309–1318.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469.
- Ioffe-Uspensky, I., Mumcuoglu, K.Y., Uspensky, I., Galun, R., 1997. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari: Ixodidae): closely related species with different biological characteristics. *J. Med. Entomol.* 34, 74–81.
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M.P., Galuppi, R., Cancrini, G., 2010. Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet. Parasitol.* 170, 291–6.
- Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2 Suppl 1, S4.
- Irwin, P.J., 2010. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1141–1156.
- Jacobson, L.S., 2006. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. *Vet. Parasitol.* 138, 126–139.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2007a. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet. Parasitol.* 144, 20–27.
- Kamani, J., Sannusi, A., Dogo, A.G., Tanko, J.T., Egwu, K.O., Tafarki, A.E., Ogo, I.N., Kemza, S., Onovoh, E., Shamaki, D., Lombin, L.H., Catto, V., Birkenheuer, A.J., 2010. *Babesia canis* and *Babesia rossi* co-infection in an untraveled Nigerian dog. *Vet. Parasitol.* 173, 334–335.
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2006. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Vet. Parasitol.* 138, 112–117.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 138, 103–111.

- Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Suksai, P., Suwannachat, P., Sariya, L., Buddhirongawatr, R., Charoonrut, P., Chaichoun, K., 2009. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40, 35–39.
- Kramer, L.D., Ebel, G.D., 2003. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv. Virus Res.* 60, 187–232.
- Lack, J.B., Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., 2012. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 42, 353–363.
- Lasbleiz, M., 2007. Situation actuelle de la babésiose canine en France: bilan d’une enquête nationale. Thèse d’exercice vétérinaire, ENV Nantes.
- Lin, E.C.Y., Chueh, L.L., Lin, C.N., Hsieh, L.E., Su, B.L., 2012. The therapeutic efficacy of two antibabesial strategies against *Babesia gibsoni*. *Vet. Parasitol.* 186, 159–164.
- Little, S.E., 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1121–1140.
- Little, S.E., Hostetler, J., Kocan, K.M., 2007. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Vet. Parasitol.* 150, 139–145.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.
- Lorusso, V., Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Tarallo, V.D., Mencke, N., Capelli, G., Otranto, D., 2010. Seasonal dynamics of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, on a confined dog population in Italy. *Med. Vet. Entomol.* 24, 309–315.
- Louly, C.C.B., Soares, S.F., Da Nóbrega Silveira, D., Guimarães, M.S., Borges, L.M.F., 2010. Differences in the behavior of *Rhipicephalus sanguineus* tested against resistant and susceptible dogs. *Exp. Appl. Acarol.* 51, 353–62.
- M’ghirbi, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152, 1–7.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastratiata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484.
- Martinod, S., Brossard, M., Moreau, Y., 1985. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. *J. Parasitol.* 71, 269–273.

- Martinod, S., Gilot, B., 1991. Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Exp. Appl. Acarol.* 11, 215–222.
- Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P., 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol.* 28, 99–105.
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008a. Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 155, 152–157.
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Oosthuizen, M.C., Jongejan, F., Penzhorn, B.L., 2008b. Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 157, 34–40.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1984. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages, *Adv. Parasitol.* 23, 37–103.
- Messick, J.B., 2003. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1453–1465.
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F.A., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B., 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117, 51–55.
- Moreira, L.A., Saig, E., Turley, A.P., Ribeiro, J.M.C., O'Neill, S.L., McGraw, E.A., 2009. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e568.
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., Failloux, A.-B., 2012. The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1989.
- Nava, S., Mastropaolo, M., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet. Parasitol.* 190, 547–555.
- Needham, G.R., Teel, P.D., 1991. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 659–681.
- Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Demma, L., Traeger, M., Johnson, B., Dickson, J., McQuiston, J., Swerdlow, D., 2006. Rocky Mountain spotted fever in Arizona: documentation of heavy environmental infestations of *Rhipicephalus sanguineus* at an endemic site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 338–341.

- Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3926–3932.
- Nonaka, E., Ebel, G.D., Wearing, H.J., 2010. Persistence of pathogens with short infectious periods in seasonal tick populations: The relative importance of three transmission routes. *PLoS ONE* 5, e11745.
- Nordgren, R.M., Craig, T.M., 1984. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.* 16, 207–214.
- Øines, Ø., Storli, K., Brun-Hansen, H., 2010. First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Vet. Parasitol.* 171, 350–353.
- Olmeda-García, A.S., Rodríguez-Rodríguez, J.A., Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Experimental transmission of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) by *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). *Vet. Parasitol.* 47, 339–342.
- Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L., 2009. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol. Res.* 105 Suppl. 1, 101–114.
- Parker, R.J., Wilson, A.J., 1979. The experimental transmission of *Anaplasma marginale* by the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* in Australia. *Aust. Vet. J.* 55, 606.
- Parker, R.R., Philip, C.B., Jellison, W.L., 1933. Rocky Mountain spotted fever: potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States. *Am. J. Trop. Med.* 8, 341–379.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928.
- Parola, P., Roux, V., Camicas, J.L., Baradji, I., Brouqui, P., Raoult, D., 2000. Detection of *Ehrlichiae* in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 707–708.
- Parola, P., Socolovschi, C., Jeanjean, L., Bitam, I., Fournier, P.-E., Sotto, A., Labauge, P., Raoult, D., 2008. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e338.
- Parola, P., Socolovschi, C., Raoult, D., 2009. Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of mediterranean spotted fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 49–54.

- Paz, G.F., Ribeiro, M.F.B., Michalsky, E.M., Da Rocha Lima, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Barata, R.A., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2010. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 106, 523–528.
- Pegram, R.G., Clifford, C.M., Walker, J.B., Keirans, J.E., 1987a. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Syst. Parasitol.* 10, 3–26.
- Pegram, R.G., Keirans, J.E., Clifford, C.M., Walker, J.B., 1987b. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Syst. Parasitol.* 10, 27–44.
- Penzhorn, B.L., Kjemtrup, A.M., López-Rebollar, L.M., Conrad, P.A., 2001. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. *J. Parasitol.* 87, 681–685.
- Pérez-Eid, C., 2007. Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire., Editions TEC&DOC, Paris, Editions Médicales Internationales, Cachan. ed. 314 pp.
- Plantard, O., Bouju-Albert, A., Malard, M.-A., Hermouet, A., Capron, G., Verheyden, H., 2012. Detection of *Wolbachia* in the tick *Ixodes ricinus* is due to the presence of the hymenoptera endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS ONE* 7, e30692.
- R Development Core Team, 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Randolph, S.E., 2010. To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? *Vet. Parasitol.* 167, 92–94.
- Reuben Kaufman, W., 2010. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1, 11–22.
- Rodhain, F., 1999. Les maladies à vecteurs, Que sais-je ? Presses universitaires de France, Paris, France, 127 pp.
- Rodhain, F., Pérez-Eid, C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine, Paris, France, 458 pp.
- Rodríguez-Mallon, A., Fernández, E., Encinosa, P.E., Bello, Y., Méndez-Pérez, L., Ruiz, L.C., Pérez, D., González, M., Garay, H., Reyes, O., Méndez, L., Estrada, M.P., 2012. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 30, 1782–1789.
- Roncagli Amici, R., 2001. The history of Italian parasitology. *Vet. Parasitol.* 98, 3–30.

- Seneviratna, P., Weerasinghe, N., Ariyadasa, S., 1973. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Res. Vet. Sci. 14, 112–114.
- Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J., Kenny, M.J., 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. Vet. Rec. 152, 176–177.
- Sikorski, L.E., Birkenheuer, A.J., Holowaychuk, M.K., McCleary-Wheeler, A.L., Davis, J.M., Littman, M.P., 2010. Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. J. Vet. Intern. Med. 24, 127–131.
- Silveira, J.A.G., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., 2009. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. Vet. Parasitol. 161, 270–275.
- Simpson, R.M., Gaunt, S.D., Hair, J.A., Kocan, K.M., Henk, W.G., Casey, H.W., 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. Am. J. Vet. Res. 52, 1537–1541.
- Socolovschi, C., Gaudart, J., Bitam, I., Huynh, T.P., Raoult, D., Parola, P., 2012. Why are there so few *Rickettsia conorii conorii*-infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the wild? PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1697.
- Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P., 2009. Influence of temperature on the attachment of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on rabbits. Clin. Microbiol. Infect. 15, Suppl 2, 326–327.
- Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. Vet. Parasitol. 181, 48–60.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T., Breitschwerdt, E., 2006. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. Emerging Infect. Dis. 12, 1985–1988.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. Vet. Parasitol. 157, 211–221.
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., João, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet. Parasitol. 130, 131–140.

- Tran A., Biteau-Coroller F., Guis H. Roger F., 2005 Modélisation des maladies vectorielles. *Epidémiol. et santé anim.* 47, 35-51
- Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet. Rec.* 152, 97–105.
- Uemura, T., Suzuki, S., Ohnishi, T., 1990. Flow cytometric enumeration of reticulocyte in the peripheral blood from canine infected with *Babesia gibsoni*. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 37, 468–472.
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia* - a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.
- Uilenberg, G., Franssen, F.F., Perié, N.M., Spanjer, A.A., 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11, 33–40.
- Uspensky, I., Ioffe-Uspensky, I., 2002. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) infestations in and near human dwellings. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 156–163.
- Vannier, E., Krause, P.J., 2009. Update on babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 984568.
- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) - A guide to the brown ticks of the world, Cambridge University Press. ed. Cambridge, UK. 643 pp.
- Wardrop, K.J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., Lappin, M.R., 2005. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 135–142.
- Welc-Faleciak, R., Rodo, A., Siński, E., Bajer, A., 2009. *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 166, 191–198.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751.
- WHO. Geneva: World Health Organization; 2006. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, sixth edition. http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf.
- WHO. Geneva: World Health Organization; 2007. The world health report 2007 - a safer future: global public health in the 21st Century. <http://www.who.int/whr/2007/en/index.html>.
- WHO. Geneva: World Health Organization; 2012. Global report for research on infectious diseases of poverty. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564489_eng.pdf

- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.* 84, 544–548.
- Zélé, F., Nicot, A., Duron, O., Rivero, A., 2012. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *J. Evol. Biol.* 25, 1243–1252.

ANNEXES

Annexe 1: Distribution des tiques dans le Paléarctique occidental (d'après Estrada-Peña et al., 2012)



Figure 23 : Distribution des espèces de tiques dans l'espace géographique du Paléarctique occidental, exprimée en pourcentage des enregistrements pour chaque cellule hexagonale de 0,5° de résolution spatiale. A. *Rhipicephalus annulatus*, B. *R. bursa*, C. *R. sanguineus*, D. *Hyalomma lusitanicum*, E *Hy. marginatum*, F. *Ixodes ricinus*, G. *Dermacentor marginatus*, H. *D. reticulatus*, I. *Haemaphysalis punctata*, J. *H. sulcata*.

Annexe 2: Fiche de commémoratifs - échantillonnage individuel

Campus vétérinaire de Lyon
JE Hémopathogènes Vectorisés

Prélèvement n° 12-036
 (à reporter sur tous les prélèvements
 issus d'un même animal : sang, tiques, lames)

Adresse d'envoi :

VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon
 Dr Magalie RENE-MARTELLET
 Service de Parasitologie
 1, avenue Bourgelat
 69 280 Marcy-l'Etoile

Tampon de la clinique

Commémoratifs :

Date du(des) prélèvement(s) :

Nom du chien :

Nom du propriétaire :

Commune (lieu de vie habituel du chien) :

L'animal a-t-il voyagé récemment (dans le mois qui a précédé la consultation) ?

Si oui, précisez

☐ oui ☐ non

L'animal est-il vacciné Pirodog®⁽¹⁾ ?

☐ oui ☐ non

L'animal est-il vacciné Nobivac Piro®⁽¹⁾ ?

☐ oui ☐ non

L'animal est-il suspect de piroplasmose ?

☐ oui ☐ non

En cas de forte suspicion de babésiose canine ou de babésiose confirmée par frottis, merci de compléter également le verso de cette fiche et de nous faire parvenir :

- 1 tube EDTA (0.5ml de sang minimum par tube)
- 1 tube sec (0.5ml de sang minimum par tube)
- La lame du frottis séchée à l'air

Prélèvements effectués :

☐ Tiques

☐ prélevées sur chien

☐ prélevées dans environnement (élevage, domicile du propriétaire)

Les tiques peuvent être conservées dans des tubes secs si l'envoi est réalisé dans les 48h. Pour un envoi différé, merci de bien vouloir les plonger dans de l'alcool non modifié⁽²⁾ (1 tube fourni avec le dispositif d'envoi) ou les congeler.

☐ Sang (1 tube EDTA + éventuellement 1 tube sec à conserver à 4°C jusqu'à l'envoi)

☐ Frottis sanguins (systématique et de préférence non coloré en cas de suspicion de pathogène sanguin)

Date d'envoi : .. / .. / ..

A remplir par VetAgro Sup : Date de réception : .. / .. / ..

Résultat Frottis :

Résultat PCR :

Identification morphologique des tiques :

⁽¹⁾ Protocole conforme aux indications du laboratoire producteur du vaccin

⁽²⁾ l'alcool vendu par les centrales d'achat est le plus souvent de l'alcool modifié (couleur jaunâtre, odeur caractéristique). L'alcool modifié est fortement déconseillé pour la réalisation de PCR.

Merci de votre participation : tout prélèvement de sang envoyé sera soumis à une recherche PCR de *Babesia* et *Anaplasmataceae* (= *Anaplasma* et *Ehrlichia*) à titre gracieux. Les informations fournies dans ce document ne seront utilisées que dans le cadre strict de cette étude et ne seront en aucun cas communiquées à des tiers. Aucun propriétaire d'animal ne sera contacté sans votre accord.

Annexe 2: Fiche de commémoratifs - échantillonnage individuel (suite)

Prélèvement n° 12 -....
 (à reporter sur tous les prélèvements
 issus d'un même animal : sang, tiques, lames)

Commémoratifs en cas de babésiose canine fortement suspectée ou confirmée par frottisSignalement de l'animal :

Race :

Sexe :

Stérilisé(e) : oui / non ⁽¹⁾

Age :

Mode de vie : urbain / rural ⁽¹⁾Signes cliniques :

Température rectale : ...

Muqueuses pâles : oui / non ⁽¹⁾Muqueuses ictériques : oui / non ⁽¹⁾Abattement : oui / non ⁽¹⁾Anorexie : oui / non ⁽¹⁾

Densité urinaire : ...

Bandelette urinaire :

<input type="checkbox"/> Protéines ⁽²⁾	+	++	+++
<input type="checkbox"/> Bilirubine ⁽²⁾	+	++	+++
<input type="checkbox"/> Sang ⁽²⁾	+	++	+++
<input type="checkbox"/> Glucose ⁽²⁾	+	++	+++

Autres : précisez :

Facteurs prédisposants ou maladie concomitante (splénectomie, immunodépression, leishmaniose, etc.):

Précisez :

Traitement administré

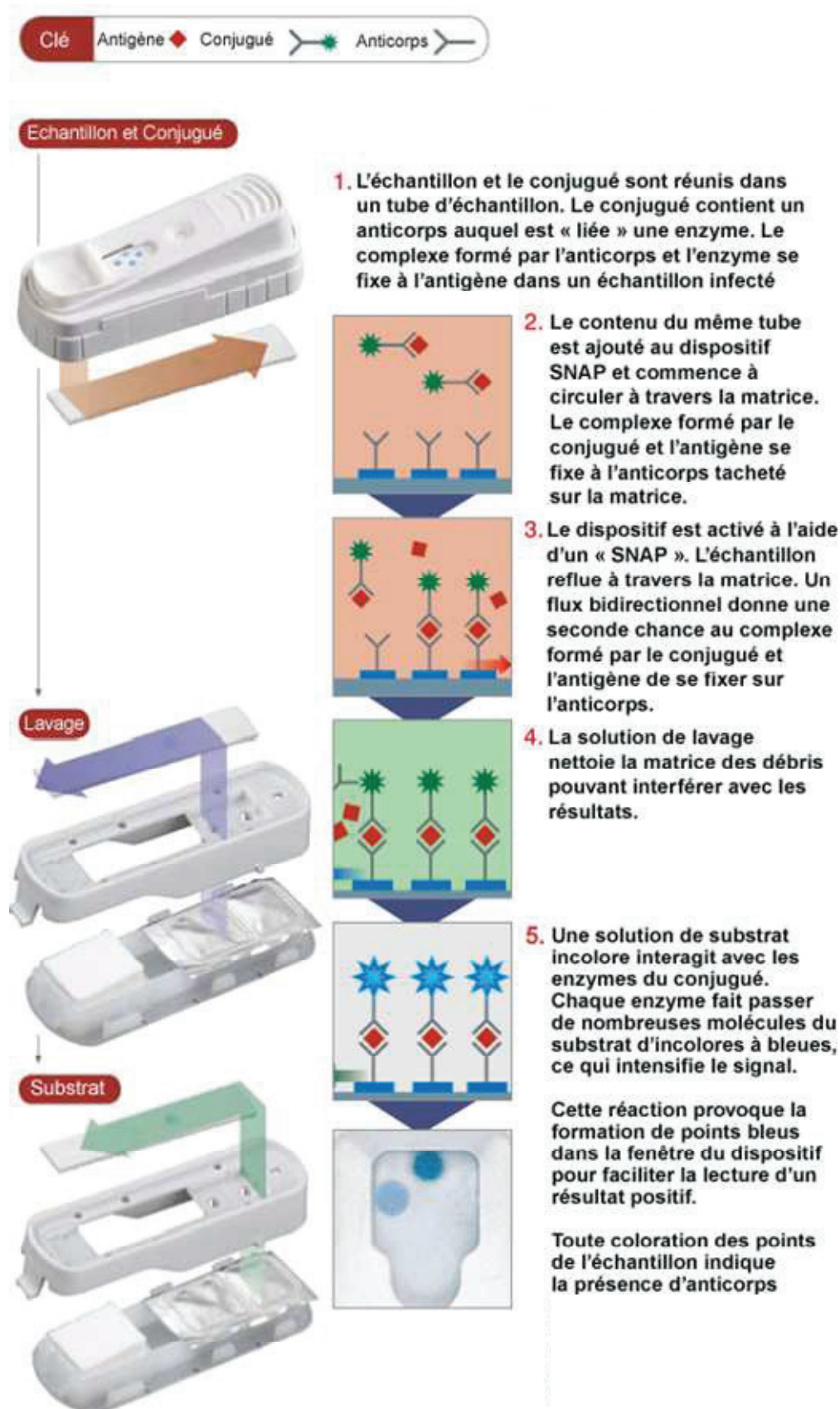
- protocole (spécialités, doses, associations thérapeutiques) :

Précisez :



⁽¹⁾ rayez les mentions inutiles⁽²⁾ entourer la mesure observée

Tampon et signature du clinicien

Annexe 3: Principe de la technologie ELISA employée dans le Test Snap® 4Dx®
 (http://www.idexx.fr/html/fr_fr/smallanimal/inhouse/snap/common/sah-elisa-blood-sample.html)





Annexe 4: Poster présenté au Congrès E-Sove (European Society for Vector Ecology), Montpellier, France, 8-11 octobre 2012.

Rhipicephalus sanguineus s.l. and *Babesia vogeli* in France: a phylogenetic approach to decipher evolutionary patterns

M. RENÉ-MARTELLET ⁽¹⁾, C. VALIENTE MORO ⁽²⁾, J. CHÉNE ⁽¹⁾, G. BOURDOISEAU ⁽¹⁾, L. CHABANNE ⁽¹⁾, P. MAVINGUI ⁽²⁾

⁽¹⁾ Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés - VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon - 1 Avenue Bourgelat - 69280 Marcy L'Etoile
⁽²⁾ Ecologie Microbienne, UMR 5557 CNRS, USC 1364 INRA, VetAgro Sup, Université Lyon 1 - 43, Bd du 11 Novembre 1918 - 69622 Villeurbanne Cedex

Introduction and aims:

Biogeography of tick species has recently changed in Europe under the influence of various factors including human activities and climate changes, thus leading to a higher frequency of tick-borne diseases. The "Brown dog tick" *Rhipicephalus sanguineus* has a worldwide distribution and is the vector of many pathogens including *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* to dogs and *Rickettsia* responsible for spotted fevers in humans [1]. The taxonomic status of *R. sanguineus* remains controversial. It is a complex of about 10 closely related species gathered under the name *R. sanguineus* group [2]. Two dissimilar populations of *R. sanguineus* ticks were recently evidenced in the world using genetic, biological and geographical criteria [3]. The first population seems to live preferentially under tropical climates while the second is essentially found under subtropical and mediterranean climates [4]. Babesiosis (or piroplasmosis) is an emerging tick-borne disease of animals and humans caused by intraerythrocytic protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* [5,6]. In dogs, infection by these parasites usually induces a haemolytic syndrome that can be fatal when complicated [6]. Within the *Babesia* genus, *Babesia vogeli* is characterized by a non homogenous clinicopathological pattern that may range from asymptomatic carriage to severe or fatal haemolytic anemia in young dogs and pups [7]. In France, canine babesiosis has a high prevalence and involves the two species *B. canis* and *B. vogeli* transmitted by *Dermacentor reticulatus* and *R. sanguineus*, respectively [7,8]. However, epidemiological data on *B. vogeli* and its tick vector are scarce in the country. The objectives of the study were (i) to improve knowledge on epidemiology of canine babesiosis in southern France (ii) to characterize at a molecular level both *Rhipicephalus sanguineus* populations and *Babesia vogeli* isolates from this area and (iii) to perform phylogenetic and phylogeographic analyses of *R. sanguineus* and *B. vogeli* at worldwide scale to infer possible ongoing coevolutionary process. This knowledge would be useful to better understand the variability of symptoms observed in dogs infected with *Babesia vogeli* species and adapt prophylactic measures including vaccines currently available in the country. In addition, improving knowledge on *R. sanguineus* tick populations will help deciphering the transmission dynamics in the context of increasing human and animal movements and climate changes.

Methods:

Dog bloods and ticks were collected in Gard and Corsica from 2010 to 2012. PCR amplifications were performed targeting 18S rRNA gene for protozoans [9] and mitochondrial 12S rRNA [10] and 16S rRNA [11] genes for ticks. *Babesia vogeli* and *R. sanguineus* ticks were characterized at a molecular level and compared with samples from different parts of the world retrieved from GenBank using phylogenetic tools.

Results:

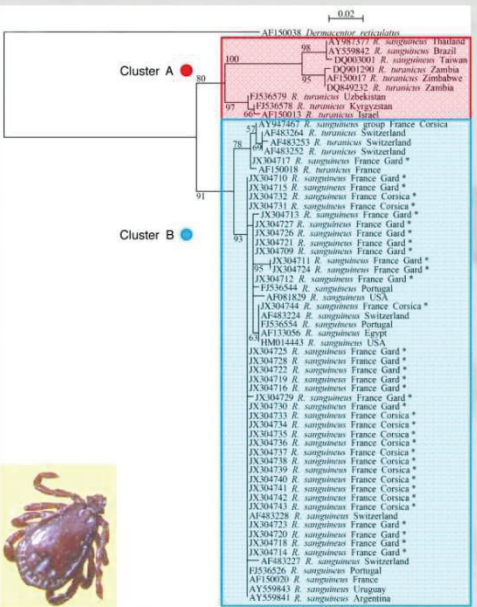


Figure 1: Phylogenetic analysis based on 317-bp of mt-12S rRNA gene sequences of *R. sanguineus* ticks from Gard and Corsica (* present study) and sequences of *R. sanguineus* and *R. turanicus* isolates from different parts of the world. The phylogenetic tree was constructed using the HKY maximum likelihood method, with bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 50\%$.

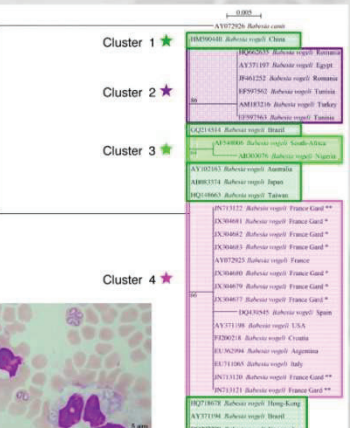


Figure 2: Phylogenetic analysis based on 283-bp of 18S rRNA gene sequences of *Babesia vogeli* obtained from naturally infected dogs from Gard (* present study, ** René et al., 2012) and sequences of *B. vogeli* isolates from GenBank. The phylogenetic tree was constructed using the HKY maximum likelihood method, with bootstrap analysis with 1000 replicates. Numbers on branches indicate support for each clade $\geq 50\%$.

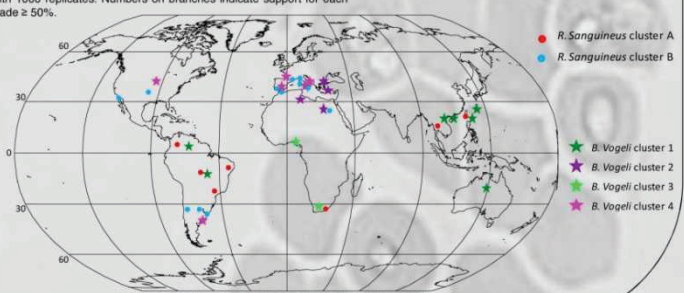


Figure 3: *R. sanguineus* and *B. vogeli* isolates used for phylogenetic analyses and their geographical location.

Conclusions:

Phylogenetic analyses confirmed the affiliation of French *R. sanguineus* isolates with 'temperate' *R. sanguineus* species. Analysis of the distribution of both *R. sanguineus* and *B. vogeli* revealed the possible existence of a co-evolutionary pattern between the vector and the pathogen. To evaluate the influence of genetic variability and vector competence on such pattern, experimental cross-infections trials using different *B. vogeli* strains and 'tropical' or 'temperate' *R. sanguineus* populations as well as transmission tests to dogs should be undertaken.

References: [1] Dantas-Torres F, *Parasit Vectors* 2010, 3:26; [2] Dantas-Torres F, *Vet. Parasitol.* 2008, 152:173–185; [3] Szabó MPJ et al., *Vet. Parasitol* 2005, 130:131–140; [4] Burlini L et al., *Exp. Appl. Acarol.* 2010, 50:361–374; [5] Irwin PJ, *Parasit Vectors* 2009, 2 Suppl 1:54; [6] Vannier E and Krause PJ, *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 984568. [7] Solano-Gallego L and Baneth G, *Vet Parasitol* 2011, 181, 48–60; [8] René M et al., *Vet. Parasitol.* 2012, 187:399–407; [9] Jefferies R et al., *Vet Parasitol* 2007, 144:20–27; [10] Szabó MPJ et al., *Vet. Parasitol* 2005, 130:131–140; [11] Black WC and Piesman J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994, 91:10034–10038.

RESUME

Étude du rôle vecteur de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* dans la transmission des babésioses canines en France : prévalence parasitaire, diversité génétique des vecteurs et épidémiologie.

La babésiose canine est une maladie parfois mortelle due à des protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria* transmis par des tiques dont *Rhipicephalus sanguineus*. Malgré la présence soutenue de *R. sanguineus* dans le Sud de la France, son rôle dans la transmission de la maladie dans cette région reste incertain. D'autre part, le statut taxonomique de *R. sanguineus* reste confus et mérite d'être clarifié. Les objectifs de ce travail ont été de caractériser (i) les tiques *R. sanguineus s.l.* parasitant les chiens dans différentes régions du Sud de la France, (ii) les espèces des genres *Babesia/Theileria* potentiellement transmises par ces tiques et (iii) l'impact des variations génétiques et/ou des co-infections sur la compétence vectorielle. Au total 140 sangs de chien et 242 tiques *R. sanguineus s.l.* ont été récoltées et analysées entre 2010 et 2012 par PCR, PCR-RFLP et séquençage. De l'ADN de *B. vogeli* et *B. canis* a été détecté dans 13,6% et 12,9% des chiens et dans 10,7% et 1,7% des tiques respectivement avec, parfois, des prévalences significativement différentes entre les régions. Un seul chien a été détecté porteur d'ADN de *T. annae*. Des comparaisons phylogénétiques et phylogéographiques de séquences de *R. sanguineus* (ADNr-mt 12S et 16S) et *B. vogeli* (ARNr 18S) à l'échelle mondiale ont confirmé l'affiliation des tiques de France aux *R. sanguineus* des régions « tempérées » et suggèrent l'existence d'une coévolution entre le protozoaire et son vecteur. Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur la babésiose canine en France et supporte l'existence d'au moins deux populations au sein du groupe *sanguineus* pouvant présenter des compétences vectorielles différentes.

ABSTRACT

Study on *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks and their potential role in the transmission of canine babesiosis in France: prevalence of parasite infections, vector genetic diversity and epidemiology.

Canine babesiosis is a potentially fatal disease caused by protozoa of the genera *Babesia* and *Theileria* transmitted by ticks including *Rhipicephalus sanguineus*. Although *R. sanguineus* is a major tick species in southern France, its role in the transmission of the disease in this area remain unknown. Moreover, the taxonomic status of *R. sanguineus* is controversial and needs to be clarified. The aims of this work were to characterize (i) the ticks *R. sanguineus s.l.* that parasitize dogs in different areas of southern France, (ii) the *Babesia/Theileria* species potentially transmitted by these ticks in this area and (iii) the impact of genetic variations and/or co-infections on vector competence. A total of 140 dog bloods and 588 *R. sanguineus s.l.* were collected from 2010 to 2012 from which all dogs bloods and 242 ticks were screened using specific PCR, PCR-RFLP and sequencing. *B. vogeli* and *B. canis* DNA were evidenced in 13.6% and 12.9% of dogs and in 10.7% and 1.7% of *R. sanguineus* ticks respectively with sometimes significant prevalence differences between areas. A single case of *T. annae* infection was detected in a dog. Phylogenetic and phylogeographic analyzes performed at a global scale on 12S and 16S mt-rDNA for ticks and 18S rDNA for *B. vogeli* confirmed the affiliation of *R. sanguineus* from France with "temperate" species and suggested the existence of a coevolution process between the pathogen and its vector. This work provides new information on the epidemiology of canine babesiosis in France and supports the existence of at least two populations in the *R. sanguineus* group in the world with possible different vector competences.

MOTS-CLES: Tique, Babésiose, Chien, *Rhipicephalus sanguineus*, *Babesia*, Epidémiologie, Phylogénie, PCR

KEYWORDS : Tick, Babesiosis, Dog, *Rhipicephalus sanguineus*, *Babesia*, Epidemiology, Phylogeny, PCR.

INTITULE ET ADRESSE DES LABORATOIRES :

1/ Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés, VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69 208 Marcy l'Etoile, France.

2/ Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, INRA USC 1193, VetAgro Sup, Université Lyon 1, Domaine scientifique de la Doua, 16 rue Raphaël Dubois, 69 622 Villeurbanne Cedex, France.